UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS DOCTORAL

Diseño, desarrollo y validación de inmunoensayos para el control y diagnóstico diferencial de animales infectados y vacunados frente al virus de la peste porcina africana

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

María Gabriela González García

DIRECTORAS

Dra. Mercedes Paloma Rueda Pérez
Dra. Patricia Sandra Sastre Antoranz

© María Gabriela González García, 2024

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOMEDICINA

TESIS DOCTORAL

MENCIÓN INDUSTRIAL

Diseño, desarrollo y validación de inmunoensayos para el control y diagnóstico diferencial de animales infectados y vacunados frente al virus de la peste porcina africana

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

María Gabriela González García

DIRECTORAS

Dra. Mercedes Paloma Rueda Pérez
Dra. Patricia Sandra Sastre Antoranz

El presente trabajo de investigación se ha llevado a cabo en la **empresa** Gold Standard Diagnostics Madrid S.A. (GSD Madrid), bajo la dirección de la Dra. Mercedes Paloma Rueda Pérez y Dra. Patricia Sandra Sastre Antoranz, así como bajo la tutoría de la Dra. María Isabel de la Mata Riesco.

El trabajo ha sido **financiado** por la Agencia Estatal de Investigación, dentro de la convocatoria "Ayudas para contratos para la formación de doctores en empresas (Doctorados Industriales) 2019" (DIN2019-010833/AEI/ 10.13039/501100011033), así como por el Programa Marco Horizonte 2020 de la Unión Europea, dentro del Proyecto *A safe DIVA vaccine for African Swine Fever control and eradication VACDIVA* (número de referencia: 862874).

Los resultados generados en la investigación descrita en esta memoria de tesis doctoral, con **Mención industrial**, se han presentado en:

- **Patente:**

    - *Method for differentiating ASFV infected from ASFV vaccinated animals.* No. de aplicación/patente en la Oficina Europea de Patentes: 22462010.4/1118 E22462010. Fecha de prioridad: 22/11/2022.

- **Publicaciones de primera autora:**

    - *Simultaneous Detection of Antigen and Antibodies of African Swine Fever in a Novel Combo Lateral Flow Assay*. Vaccines, 12 (3). DOI: 10.3390/vaccines12030307.
    - *A novel prototype ASFV DIVA serological assay based on the detection of antibodies against pEP153R, eGFP and a well-known immunogenic antigen*. Vaccines. Manuscrito en proceso de aprobación.

Adicionalmente, se ha mantenido una constante y estrecha **colaboración** con el grupo de investigación en enfermedades emergentes y transfronterizas del Centro de Investigación en Sanidad Animal del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, que es Laboratorio de Referencia de la Unión Europea para la peste porcina africana, así como con el grupo de investigación de Vigilancia sanitaria del Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, Laboratorio de Referencia de la Organización Mundial de Sanidad Animal en peste porcina africana.

A mis padres

A mis hermanas

Agradecimientos

Al finalizar este largo camino, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todas aquellas personas que, de una u otra forma, han contribuido a que esta tesis fuera posible.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directoras de tesis. Paloma y Patricia, vuestra orientación ha sido fundamental en el desarrollo de este trabajo. Agradezco cada conversación, cada corrección y cada sugerencia, sobre todo durante estos últimos meses. Habéis conseguido enriquecer este trabajo y me habéis permitido crecer como investigadora y como persona.

También a cada persona de GSD Madrid, o INGENASA, como lo seguimos llamando nosotros. En especial, a aquellos que habéis puesto vuestras cabezas y manos para que este trabajo saliera adelante, Ángel, Nuria, Mercedes, Tamara, Sonia, Cristina, Luis, Esther y Kiko, parte de estos resultados también son gracias a vosotros. A Diana y a Isa, por ayudarme a buscar en los congeladores las mil muestras que os pedía. Quiero también agradecer a Mari carmen, por siempre estar dispuesta a ayudarme con cualquier tema administrativo. Y a Carmen G. porque, aunque no estuvo 100 % ligada a este proyecto, fue mi primera tutora en la empresa y me enseñó a pensar de forma analítica sobre las maravillas de la ciencia, y eso no lo voy a olvidar nunca. También a aquellos que me han devuelto una sonrisa por los pasillos, o han compartido momentos de risa en el laboratorio o el comedor, y que de alguna manera me han inspirado a no rendirme y a dar siempre lo mejor de mí.

Y por supuesto, a mis amigos en la empresa, "los jóvenes", gracias por el ambiente dentro y fuera del laboratorio que hemos creado juntos. En especial a Cristina, por todas nuestras conversaciones llenas de confianza y tu inmenso apoyo durante este proceso.

No quiero dejar de agradecer a todos aquellos que hicieron posible que contara con las muestras necesarias para desarrollar los ensayos. En primer lugar, a los chicos del L-6 del CISA, sobre todo a Carmina, por su apoyo y compromiso con este proyecto, y a Nadia, que hizo que desde la primera visita al P3, me sintiera como en casa. También al grupo SUAT del VISAVET, en especial a Sandra, por haberme permitido entrar en vuestro laboratorio y analizar cuantas muestras pudiera. Y al IZSUM, sobre todo a Mónica y Fede, por haberme dado la oportunidad de visitar

vuestro centro y conocer Perugia. También al resto de laboratorios de VACDIVA, que durante un verano estuvieron dedicados a analizar muestras.

Por supuesto, también agradezco profundamente a aquellos que han estado fuera, pero a la vez dentro de este contexto. Primero, a mi familia, mi abuela, mis padres, hermanas y hermano putativo, sin vuestro amor durante estos años este trabajo no habría sido posible. Gracias por haber sido los primeros en creer en mí y haberme brindado vuestro apoyo incondicional durante toda mi vida. También quiero expresar mi más profundo agradecimiento a Alejandro, mi compañero de vida. Gracias por tu paciencia, por tu constante apoyo y por estar a mi lado en este viaje. Gracias por celebrar cada pequeño logro, por escuchar mis preocupaciones. Has sido mi hogar y refugio.

A mis amigos, Sara, Paula, los "Elemelons" y a los chicos de la "M", habéis compartido conmigo muchos momentos de risas y habéis hecho que este proceso fuese más llevadero. Vuestra amistad ha sido fundamental para mantenerme motivada y recordar que no estaba sola.

Y aunque no sea muy común en este tipo de trabajo, quiero dedicar unas palabras de agradecimiento a mí misma. Agradezco a la persona que fui cuando inicié este viaje, llena de entusiasmo y curiosidad, así como a la que persistió en los momentos difíciles, que aprendió a ser resiliente y a confiar en sus propias capacidades. Gabriela, esta tesis es un reflejo de tu esfuerzo y un recordatorio de que, con horas de trabajo, sacrificio y fuerza interior, se puede alcanzar cualquier objetivo.

Muchas gracias a todos, de corazón.

Índice de contenido

ABREVIATURAS XIX

RESUMEN XXIII

ABSTRACT XXVII

CAPÍTULO I - INTRODUCCIÓN 1

I. 1. DESCRIPCIÓN DEL VIRUS Y LA ENFERMEDAD 3
I. 1. 1. Epidemiología 6
I. 1. 2. Patogenia 8
I. 2. DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD 10
I. 3. CONTROL Y VIGILANCIA DE LA ENFERMEDAD 16
I. 4. VACUNAS 18
I. 5. APROXIMACIÓN DIVA 22

CAPÍTULO II - OBJETIVOS 29

CAPÍTULO III - MATERIALES Y MÉTODOS 33

III. 1. MATERIALES 35
III. 1. 1. Células 35
III. 1. 1. 1. Cepas bacterianas 35
III. 1. 1. 2. Líneas celulares de insecto 35
III. 1. 1. 3. Líneas celulares de mamífero 35
III. 1. 2. Medios de cultivo 36
III. 1. 3. Virus 36
III. 1. 4. Genes sintéticos 37
III. 1. 5. Oligonucleótidos 38
III. 1. 6. Vectores 39
III. 1. 7. Anticuerpos monoclonales 41
III. 1. 8. Muestras biológicas 41
III. 1. 8. 1. Muestras experimentales 42
III. 1. 8. 1. 1. Sueros experimentales 42
III. 1. 8. 1. 2. Otras muestras experimentales 46
III. 1. 8. 2. Muestras de campo 47
III. 1. 8. 2. 1. Muestras negativas de campo de zonas libres de PPA 47
III. 1. 8. 2. 2. Muestras de campo de zonas donde ha circulado el vPPA 47
III. 1. 9. Soluciones y tampones 48
III. 2. MÉTODOS 50
III. 2. 1. Condiciones de los cultivos celulares 50

III. 2. 1. 1. Bacterias 50
III. 2. 1. 2. Células de insecto 50
III. 2. 1. 3. Células de mamífero 50
III. 2. 2. Clonación de los genes codificantes de las proteínas de interés 51
III. 2. 2. 1. Amplificación del gen sintético 51
III. 2. 2. 2. Visualización y purificación de los productos de la PCR 51
III. 2. 2. 3. Clonación mediante enzimas de restricción 51
III. 2. 2. 4. Clonación mediante el sistema Gateway® 52
III. 2. 2. 5. Aislamiento de clones 53
III. 2. 2. 6. Amplificación, purificación y secuenciación del plásmido recombinante 53
III. 2. 3. Expresión de proteínas recombinantes 54
III. 2. 3. 1. Expresión en bacterias 54
III. 2. 3. 2. Expresión en células de insecto 55
III. 2. 3. 3. Expresión en células de mamífero 58
III. 2. 4. Solubilización y purificación de proteínas recombinantes 58
III. 2. 4. 1. Solubilización 58
III. 2. 4. 1. 1. Solubilización mediante sarcosilo 58
III. 2. 4. 1. 2. Solubilización mediante cloruro de guanidinio 59
III. 2. 4. 2. Purificación de proteínas por afinidad 59
III. 2. 4. 2. 1. Cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC) 59
III. 2. 4. 2. 2. Cromatografía de afinidad a proteína A y/o proteína G 59
III. 2. 4. 2. 3. Cromatografía de afinidad a glutatión 60
III. 2. 5. Técnicas de análisis de proteínas 60
III. 2. 5. 1. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) 60
III. 2. 5. 2. Tinciones de SDS-PAGE y cuantificación de proteínas 60
III. 2. 5. 3. Análisis de secuencias 61
III. 2. 6. Producción de anticuerpos monoclonales 62
III. 2. 6. 1 Inmunización de ratones 62
III. 2. 6. 2 Fusión celular y selección de hibridomas específicos 62
III. 2. 6. 3 Purificación y marcaje de los anticuerpos monoclonales 63
III. 2. 7. Inmunoensayos 64
III. 2. 7. 1. Inmunodetección en membranas de nitrocelulosa (western blot) 64
III. 2. 7. 2. ELISA 65
III. 2. 7. 2. 1. ELISA indirecto 65
III. 2. 7. 2. 2. ELISA directo 66
III. 2. 7. 2. 3. ELISA de competición 66
III. 2. 7. 3. ELISA-microarray 67
III. 2. 7. 3. 1. Impresión del microarray 67

III. 2. 7. 3. 2. Procedimiento del inmunoensayo 68
III. 2. 7. 4. Ensayos de campo: LFA 70
III. 2. 7. 4. 1. Preparación de reactivos reveladores 70
III. 2. 7. 4. 2. Preparación de los reactivos de captura 71
III. 2. 7. 4. 3. Preparación de las tiras de LFA 72
III. 2. 7. 4. 4. Procedimiento de los ensayos 73
III. 2. 8. Análisis estadístico 73

CAPÍTULO IV - RESULTADOS 75

IV. 1. PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS REACTIVOS CLAVE PARA EL DESARROLLO DE LOS INMUNOENSAYOS 78
IV. 1. 1. Proteína 9GL 78
IV. 1. 1. 1. Producción de la proteína 9GL 78
IV. 1. 1. 2. Análisis de la antigenicidad de la proteína 9GL 82
IV. 1. 2. Proteína EP153R 84
IV. 1. 2. 1. Análisis de las secuencias de la pEP153R 84
IV. 1. 2. 2. Proteína EP153R de genotipo II 86
IV. 1. 2. 2. 1. Producción de la pEP153R de genotipo II 86
IV. 1. 2. 2. 2. Análisis de la antigenicidad de la pEP153R de genotipo II 88
IV. 1. 2. 2. 3. Mejora del rendimiento de la proteína pEP153R genotipo II 91
IV. 1. 2. 3. Proteína EP153R de genotipo I 94
IV. 1. 2. 3. 1. Producción de la pEP153R de genotipo I 94
IV. 1. 2. 3. 2. Análisis de la antigenicidad de la pEP153R de genotipo I 96
IV. 1. 3. Proteína CD2v 98
IV. 1. 3. 1. Análisis de secuencias de la proteína CD2v 98
IV. 1. 3. 2. Producción recombinante de la proteína CD2v 99
IV. 1. 3. 3. Análisis de la antigenicidad de CD2v 102
IV. 1. 3. 4. Mejora del rendimiento de la expresión de la proteína CD2v 104
IV. 1. 4. Proteína eGFP 106
IV. 1. 4. 1. Producción de la eGFP 106
IV. 1. 4. 2. Análisis de la antigenicidad de la eGFP 108
IV. 1. 5 Proteína mCherry 110
IV. 1. 5. 1 Expresión de mCherry 110
IV. 1. 5. 2 Análisis de la antigenicidad de la proteína mCherry 111
IV. 1. 6. Producción de anticuerpos monoclonales frente a la proteína eGFP 112
IV. 1. 6. 1. Obtención de anticuerpos monoclonales 113
IV. 1. 6. 2. Caracterización de los anticuerpos monoclonales 114
IV. 2. DESARROLLO DE UN ELISA DIVA 116
IV. 2. 1. Optimización de las condiciones de los ELISA 117
IV. 2. 2. Evaluación del ensayo con muestras de suero 118

IV. 2. 2. 1. Sueros procedentes de cerdos domésticos experimentales 119
IV. 2. 2. 2. Sueros procedentes de jabalíes experimentales..... 123
IV. 2. 2. 3. Sueros procedentes de animales negativos a PPA..... 125
IV. 2. 3. Evaluación del ensayo con muestras alternativas..... 126
IV. 2. 3. 1. Muestras de sangre..... 126
IV. 2. 3. 2. Muestras de tejidos..... 128
IV. 2. 4. Validación del ensayo con muestras procedentes de animales de campo 130
IV. 2. 4. 1. Muestras procedentes de jabalíes de campo..... 131
IV. 2. 4. 2. Muestras procedentes de cerdos de campo 137
IV. 2. 5. Transferencia del ensayo DIVA a un producto comercial 139
IV. 2. 5. 1. Análisis de la caducidad de reactivos..... 139
IV. 2. 5. 2. Análisis de la reproducibilidad del ensayo..... 140
IV. 2. 5. 3. Repetibilidad intraplaca e interplaca 141
IV. 3. DISEÑO Y DESARROLLO DE UN ENSAYO MÚLTIPLE DIVA: ELISA-MICROARRAY 142
IV. 3. 1. Optimización de las condiciones del ensayo con muestras de suero..... 142
IV. 3. 2. Análisis con muestras de sueros..... 146
IV. 4. DISEÑO Y PUESTA A PUNTO DE ENSAYOS RÁPIDOS DE CAMPO 150
IV. 4. 1. Ensayo LFA DIVA 150
IV. 4. 1. 1. LFA eGFP..... 150
IV. 4. 1. 2. LFA pEP153R de genotipo II..... 153
IV. 4. 2. Ensayo LFA doble: detección simultánea de antígeno y anticuerpo..... 154
CAPÍTULO V - DISCUSIÓN..... 159
CAPÍTULO VI - CONCLUSIONES 189
CAPÍTULO VII - BIBLIOGRAFÍA..... 193

Índice de figuras

Figura I.1. Estructura del virión del virus de la peste porcina africana....4
Figura I.2. Hospedadores del virus de la peste porcina africana....8
Figura I.3. Cinética del nivel de viremia y anticuerpos durante la infección del virus de la peste porcina africana....11
Figura I.4. Secuencia de técnicas de laboratorio para diagnosticar la presencia de la peste porcina africana (PPA)....17
Figura I.5. Esquema de la aproximación DIVA....23
Figura I.6. Esquema de un ELISA-*microarray* 27
Figura I.7. Esquema de una inmunocromatografía de flujo lateral (LFA) 28
Figura III.1. Reacciones del sistema de clonación Gateway® (ThermoFisher) 52
Figura III.2. Generación del genoma recombinante de baculovirus....55
Figura III.3. Imagen al microscopio óptico de células Sf9 56
Figura III.4. Esquema de un ELISA indirecto....65
Figura III.5. Esquema de un ELISA de competición 67
Figura III.6. Tratamiento de imagen durante la lectura del ELISA-*microarray*....69
Figura III.7. Esquema de una inmunocromatografía de flujo lateral (LFA) de doble reconocimiento....70
Figura III.8. Componentes de una inmunocromatografía de flujo lateral (LFA)....72
Figura III.9. Interpretación de los resultados obtenidos en el LFA....73
Figura IV.1. Cinética de expresión a 37 °C de las dos versiones de la proteína 9GL expresadas en *E. coli* 79
Figura IV.2. Análisis de la solubilización y purificación de la proteína 9GL expresada en *E. coli*, mediante SDS-PAGE-tinción con Coomassie....80
Figura IV.3. Análisis de la expresión de la proteína His-9GL (Sf9) mediante SDS-PAGE 81
Figura IV.4. Análisis de la antigenicidad de las versiones recombinantes de la proteína 9GL mediante ELISA indirecto....83
Figura IV.5. Análisis de las secuencias de aminoácidos de la pEP153R....85
Figura IV.6. Análisis de la expresión y purificación de la pEP153R II-TEV-Fc a día 6 postransfección. 87
Figura IV.7. Cuantificación de la pEP153R II-TEV-Fc. Densitometría de SDS-PAGE-tinción de plata....87
Figura IV.8. Análisis de la antigenicidad de la pEP153R de genotipo II....89
Figura IV.9. Análisis de la antigenicidad de la pEP153R de genotipo II....91
Figura IV.10. Análisis de la expresión y purificación de la proteína pEP153R II-Fc 93
Figura IV.11. Comparativa de los dos antígenos recombinantes obtenidos de la pEP153R de genotipo II. 94

Figura IV.12. Análisis de la expresión y purificación de la pEP153R I-Fc 95
Figura IV.13. Análisis de la antigenicidad de la pEP153R de genotipo I, mediante ELISA indirecto 97
Figura IV.14. Análisis de las secuencias de la proteína CD2v 98
Figura IV.15. Análisis de la expresión de la proteína His-CD2v en células de insecto. .. 100
Figura IV.16. Análisis de la expresión de la proteína CD2v en células de insecto infectadas con AcHLTA/EP402R #6, mediante SDS-PAGE 101
Figura IV.17. Análisis de la antigenicidad de la proteína CD2v mediante ELISA indirecto 103
Figura IV.18. Análisis de la antigenicidad de la proteína CD2v en animales infectados experimentalmente con aislados del vPPA. 104
Figura IV.19. Cuantificación de las proteínas eGFP expresadas en *E. coli*. 106
Figura IV.20. Análisis de la expresión y purificación de la proteína His-eGFP (Sf9) 107
Figura IV.21. Análisis de la antigenicidad de la proteína eGFP 109
Figura IV.22. Análisis de la expresión y purificación de la proteína His-mCherry (*E. coli*) 110
Figura IV.23. Análisis de la expresión y purificación de la proteína His-mCherry (Sf9) mediante SDS-PAGE. 111
Figura IV.24. Estudio de la antigenicidad de la mCherry mediante ELISA indirecto, frente a las versiones recombinantes His-mCherry (*E. coli*) e His-mCherry (Sf9) 112
Figura IV.25. Titulación en ELISA indirecto de los sueros procedentes de ratones inmunizados con eGFP. 113
Figura IV.26. Titulación de los anticuerpos monoclonales (AcM) anti-eGFP seleccionados 114
Figura IV.27. Optimización del diluyente de muestra en el ELISA pEP153R. 117
Figura IV.28. Diagrama interactivo de puntos (análisis ROC) para los ELISA desarrollados 119
Figura IV.29. Respuesta serológica de cerdos domésticos experimentales 121
Figura IV.30. Datos del ELISA DIVA en muestras de cerdos domésticos experimentales 122
Figura IV.31. Respuesta serológica de jabalíes experimentales 124
Figura IV.32. Datos del ELISA DIVA en muestras de jabalíes experimentales 125
Figura IV.33. Análisis de la sensibilidad y/o especificidad diagnóstica de los ensayos.. 131
Figura IV.34. Sensibilidad diagnóstica del ELISA pEP153R en muestras procedentes de jabalíes de campo 132
Figura IV.35. Sensibilidad del ELISA pEP153R en muestras de jabalíes de campo, positivas a anticuerpos en IPT (ensayo de referencia) 133
Figura IV.36. Sensibilidad del ELISA pEP153R en muestras procedentes de jabalíes, positivas en el ELISA control INgezim® ASFV-R. 134

Figura IV.37. Flujo de la caracterización mediante serología y qPCR de rutina de las muestras positivas a PPA de jabalíes 135
Figura IV.38. Flujo de la caracterización mediante ELISA DIVA y qPCR de rutina de los jabalíes experimentales vacunados 136
Figura IV.39. Flujo de la caracterización mediante serología y qPCR de rutina de las muestras positivas a PPA de cerdos domésticos. 138
Figura IV.40. Estudio de la caducidad 140
Figura IV.41. Análisis del a reproducibilidad del ELISA pEP153R y del ELISA eGFP 141
Figura IV.42. Optimización del ELISA-*microarray* para los puntos correspondientes a los antígenos p30, pEP153R II-Fc y GST-eGFP 143
Figura IV.43. Optimización del ELISA-*microarray* para los antígenos p72, pEP153R II-Fc y GST-eGFP 144
Figura IV.44. Análisis de la impresión del antígeno eGFP 145
Figura IV.45. Configuración final del *microarray* 145
Figura IV.46. Diagrama interactivo de puntos (análisis ROC) del ELISA-*microarray* para los antígenos incluidos en el ensayo 148
Figura IV.47. Ensayo INgezim® ASFV Combo CROM Ag/Ab 154
Figura IV.48. Análisis de muestras de sangre procedentes de animales de campo infectados con el vPPA en el ensayo INgezim® ASFV Combo CROM Ag/Ab 156
Figura IV.49. Análisis de muestras de sangre en el ensayo INgezim® ASFV Combo CROM Ag/Ab, agrupadas por animal 157

Índice de Tablas

Tabla I.1. Descripción de las formas clínicas de la peste porcina africana 10
Tabla I.2. Características de las técnicas de diagnóstico directo 13
Tabla I.3. ELISA comerciales de detección de anticuerpos frente al vPPA disponibles actualmente en el mercado 14
Tabla I.4. Características de las técnicas de diagnóstico indirecto....15
Tabla I.5. Características de los distintos tipos de vacunas candidatas frente al vPPA....22
Tabla I.6. Características de las tres plataformas de diagnóstico que se utilizan en el presente trabajo de tesis doctoral....28
Tabla III.1. Medios de cultivo utilizados....36
Tabla III.2. Baculovirus recombinantes producidos....37
Tabla III.3. Genes sintéticos....37
Tabla III.4. Oligonucleótidos específicos utilizados en la clonación de los genes....38
Tabla III.5. Oligonucleótidos generales....39
Tabla III.6. Vectores utilizados 39
Tabla III.7. Plásmidos recombinantes generados....40
Tabla III.8. Anticuerpos monoclonales comerciales utilizados en el presente trabajo. ..41
Tabla III.9. Anticuerpos monoclonales generados en el presente trabajo 41
Tabla III.10. Vacunas candidatas....42
Tabla III.11. Sueros experimentales utilizados en el estudio de infecciones con vPPA o candidatos vacunales....45
Tabla III.12. Tejidos procedentes de animales experimentales 47
Tabla III.13. Muestras de campo utilizadas en la validación de los ensayos 48
Tabla III.14. Tampones y soluciones empleados....48
Tabla III.15. Coeficientes de extinción molar (ε) de las versiones recombinantes de las proteínas de interés cuantificadas por absorbancia....61
Tabla IV.1. Parámetros obtenidos en la expresión y solubilización/purificación de las versiones recombinantes de la proteína 9GL....82
Tabla IV.2. Muestras de sueros analizadas para la determinación de la antigenicidad de la pEP153R de genotipo II....90
Tabla IV.3. Sueros utilizados en la optimización del ELISA indirecto de la pEP153R de genotipo I....96
Tabla IV.4. Características de las versiones recombinantes de la proteína eGFP....108
Tabla IV.5. Caracterización de los cinco anticuerpos monoclonales obtenidos....115
Tabla IV.6. Interpretación del DIVA serológico 116
Tabla IV.7. Condiciones finales seleccionadas para los ELISA indirectos desarrollados 118

Tabla IV.8. Sueros procedentes de cerdos domésticos infectados (Grupo A1) o vacunados (Grupo A2) experimentalmente 120
Tabla IV.9. Sueros procedentes de jabalíes infectados (Grupo B1) o vacunados (Grupo B2) experimentalmente 123
Tabla IV.10. Resultados de las muestras de suero en el ELISA pEP153R y el ELISA eGFP, consideradas en el análisis comparativo con sangres pareadas 127
Tabla IV.11. Resultados de las muestras de suero en el ELISA pEP153R y ELISA eGFP, consideradas en el análisis comparativo con sangres recogidas en papel de filtro 128
Tabla IV.12. Resultados en el ELISA pEP153R y eGFP con muestras de tejidos procedentes de los animales cuyos sueros pareados fueron positivos en el ELISA correspondiente 129
Tabla IV.13. Muestras analizadas procedentes de animales de campo 130
Tabla IV.14. Condiciones de impresión del *microarray* y del ELISA-*microarray* DIVA .. 146
Tabla IV.15. Muestras experimentales analizadas mediante ELISA-*microarray* 147
Tabla IV.16. Combinaciones iniciales de los reactivos reveladores y de captura en el LFA eGFP, numeradas del 1 al 9 151
Tabla IV.17. Combinaciones para la selección de la concentración del reactivo revelador y del reactivo de captura en el LFA eGFP, numeradas del 10 al 15 152
Tabla IV.18. Condiciones finales del LFA eGFP 152
Tabla IV.19. Combinaciones para la selección de la concentración del reactivo revelador y del reactivo de captura en el LFA pEP153R de genotipo II, numeradas del 1 al 9 153

Abreviaturas

µg	Microgramo(s)
µl	Microlitro(s)
µm	Micrómetros(s)
AcM	Anticuerpo(s) monoclonal(es)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Amp	Ampicilina
BCA	Ácido bicinconínico
BDV	Virus de la enfermedad de la frontera (de sus siglas en inglés, *Border Disease Virus*)
BSL-3	Nivel de bioseguridad 3 (de sus siglas en inglés, *Biosafety Level* 3)
BVDV	Virus de la diarrea viral bovina (de sus siglas en inglés, *Bovine Viral Diarrhoea Virus*)
Ct	Valor del ciclo umbral (de sus siglas en inglés, *Cycle Threshold*)
DIVA	Diferenciación entre animales infectados y vacunados (de sus siglas en inglés, *Differentiating Infected from Vaccinated Animals*)
DO	Densidad óptica
dpi	Días posinfección
dpt	Días postransfección
dpv	Días posvacunación
eGFP	Proteína verde fluorescente (de sus siglas en inglés, *Enhanced Green Fluorescent Protein*)
ELISA	Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (de sus siglas en inglés, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)
FI	Fracción insoluble
FS	Fracción soluble
h	Hora(s)
H_2Od	Agua destilada
HA	Hemadsorción
HAU_{50}	50 % de unidades de hemadsorción
IB	*Immunoblotting*
IC	Intervalo de confianza
IFA	Inmunofluorescencia indirecta
IFD	Inmunofluorescencia directa
Ig	Inmunoglobulina
IPT	Ensayo de inmunoperoxidasa indirecta (de sus siglas en inglés, *Indirect Immunoperoxidase Test*)
IS	Intensidad de señal

kba	Kilobase(s)
kDa	Kilodalton
LAV	Vacunas vivas atenuadas (de sus siglas en inglés, *Live attenuated vaccines*)
LB	Luria-Broth
LFA	Inmunocromatografía de flujo lateral (de sus siglas en inglés, *Lateral Flow Assay*)
M	Molar
M&M	Materiales y Métodos
m/v	Masa (g)/volumen (ml)
M-CN	DO de la muestra menos DO del control negativo del ensayo
mdi	Multiplicidad de infección
mg	Miligramo(s)
MHC-I	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (de sus siglas en inglés, *Major histocompatibility complex class I*)
MHC-II	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (de sus siglas en inglés, *Major histocompatibility complex class II*)
min	Minuto(s)
mM	Milimolar
mseg	Milisegundo(s)
n	Tamaño de muestra
ng	Nanogramos(s)
nm	Nanómetro(s)
OMSA	Organización Mundial de Sanidad Animal
ORF	Marco abierto de lectura (de sus siglas en inglés, *Open Reading Frame*)
FA	Fosfatasa alcalina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PO	Peroxidasa
PPA	Peste porcina africana
PPC	Peste porcina clásica
qPCR	PCR a tiempo real
rpm	Revoluciones por minuto
SB	Sobrenadante del cultivo celular
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
seg	Segundo(s)
SNR	Señal de ruido
Spc	Espectinomicina
Ta	Temperatura ambiente
$TCDI_{50}$	Dosis infecciosa de cultivo de tejido al 50 % (de sus siglas en inglés, *Tissue Culture Infective Dose*)
TEV	Virus del grabado del tabaco (de sus siglas en inglés, *Tobacco Etch Virus*)

Tm	Temperatura de anillamiento
U	Unidad de actividad enzimática
UA	Unidades arbitrarias
UE	Unión Europea
ufp	Unidades formadoras de placa
v/v	Volumen (ml)/volumen (ml)
vPPA	Virus de la peste porcina africana
vPPC	Virus de la peste porcina clásica

Resumen

La peste porcina africana (PPA) está causada por el virus de la PPA (vPPA) y constituye una de las enfermedades infecciosas más significativas que afectan a las explotaciones porcinas y a suidos salvajes. En la última década, se han notificado brotes de la enfermedad globalmente, provocando considerables pérdidas económicas. Este contexto ha intensificado la urgencia de su control, que actualmente está basado, principalmente, en un sistema de vigilancia obligatorio y continuo. Sin embargo, sigue siendo necesario el desarrollo de una vacuna eficaz y segura para la erradicación de la enfermedad. Hasta la fecha, la estrategia más prometedora para la obtención de candidatos vacunales frente al vPPA ha sido la atenuación del virus mediante la deleción de genes específicos (marcadores negativos) y el uso de genes reporteros como marcadores positivos. Una de las propiedades más importantes de cualquier vacuna es que permita diferenciar entre animales infectados y vacunados (DIVA). Actualmente, ninguna de las vacunas comerciales disponibles frente al vPPA presenta esta característica a nivel serológico. Así, surge el proyecto europeo VACDIVA, en el que se han generado diferentes candidatos vacunales con potenciales propiedades DIVA.

El objetivo principal del presente trabajo de tesis ha sido el desarrollo y diseño de un ensayo de diagnóstico de tipo DIVA frente al vPPA, para cerdo doméstico y jabalí. Para ello, se han producido las proteínas codificadas por los genes marcadores negativos, 9GL, pEP153R y CD2v, así como las proteínas reporteras, eGFP y mCherry. Estas proteínas se expresaron en distintos sistemas de expresión, incluyendo bacterias, células de insecto y células de mamífero y, posteriormente, se estudió su antigenicidad, en un escenario de infección o vacunación frente al vPPA.

Dos de estas proteínas, pEP153R de genotipo II y eGFP, se seleccionaron como antígenos para desarrollar un ensayo serológico DIVA. Este ensayo se diseñó para acompañar a la vacuna Lv17/WB/Rie1-ΔEP153R-ΔEP402R, así como a todos sus derivados, que tienen el gen EP153R como marcador negativo y el gen eGFP como marcador positivo. Además, el ensayo incorporó la detección de anticuerpos frente a una proteína control, p72 o p30, presente tanto en la vacuna como en el virus parental (marcador constitutivo), permitiendo así el seguimiento de la inmunización y la diferenciación entre una infección y una respuesta vacunal.

La plataforma de diagnóstico principalmente utilizada fue el ELISA. Este ensayo se evaluó con muestras de sueros de animales infectados y vacunados experimentalmente, recogidas a diferentes tiempos. En total, se analizaron 486 muestras, siendo 313 procedentes de cerdos domésticos y 173 de jabalíes. Asimismo, se incluyeron 384 muestras de suero de animales de campo de zonas libres de PPA para evaluar la especificidad del ensayo. Utilizando la detección de anticuerpos frente a la p72 como referencia en este estudio, el ELISA pEP153R mostró una sensibilidad del 75,3 % y una especificidad del 99,9 %. La menor sensibilidad observada para el ELISA pEP153R fue debida al retraso en la seroconversión de los animales frente a esta proteína, en comparación con la aparición de anticuerpos frente a la proteína control p72. Por otro lado, el ELISA eGFP mostró una sensibilidad del 90,0 % y especificidad del 99,9 %.

Posteriormente, el ensayo se adaptó a un formato comercial y se validó en laboratorios nacionales de referencia para la PPA de diferentes países europeos, utilizando muestras de diversas matrices procedentes de animales de campo infectados o no infectados. Esta adaptación comercial permitió una evaluación del ensayo en un entorno práctico, facilitando así su potencial implementación en programas de control de la enfermedad.

A continuación, el ensayo DIVA se transfirió a la plataforma múltiple ELISA-*microarray*, para facilitar la detección simultánea de anticuerpos frente a todos los antígenos del ELISA DIVA (p72, p30, pEP153R genotipo II y eGFP) en un único ensayo. Además, se incluyeron dos antígenos adicionales, la pEP153R del vPPA de genotipo I y la proteína E2 del virus de la peste porcina clásica. Los parámetros diagnósticos obtenidos en el ensayo séxtuple fueron comparables a los obtenidos en los ELISA individuales, demostrando la viabilidad de esta plataforma para facilitar el cribado de las muestras.

Finalmente, el ensayo DIVA se adaptó a la tecnología de inmunocromatografía de flujo lateral (LFA), una plataforma que permite el diagnóstico *in situ* y, por tanto, especialmente útil en campo. Los resultados obtenidos mostraron buenos parámetros diagnósticos en la detección de anticuerpos frente a la eGFP (LFA eGFP), mientras que no fue posible la detección de anticuerpos frente a la pEP153R en un formato rápido. No obstante, la combinación de los ensayos rápidos de detección de anticuerpos frente a la proteína eGFP, junto con la detección de anticuerpos frente a la p72, podría ser de gran valor en el seguimiento de la vacunación.

Las propiedades DIVA son esenciales en una vacuna, siendo necesario un ensayo acompañante que permita un diagnóstico diferencial. Los inmunoensayos serológicos DIVA desarrollados en este trabajo podrían suponer una herramienta útil en la vigilancia de la enfermedad en aquellas zonas donde se aplique una vacuna que tenga el gen EP153R como marcador negativo y el gen eGFP como marcador positivo.

Adicionalmente, se validó una carcasa doble de LFA, para incluir en un mismo dispositivo la detección de antígeno y anticuerpos para la vigilancia y detección del vPPA. Los resultados obtenidos en la validación en campo de este nuevo dispositivo demostraron que la detección rápida combinada de antígeno y anticuerpos frente al virus, puede ser una herramienta útil en el control actual de la enfermedad, especialmente en animales salvajes.

Los estudios presentados en esta tesis doctoral aportan nuevos datos relativos a marcadores para el diagnóstico DIVA de la PPA. Además, se han desarrollado nuevas herramientas diagnósticas, tanto a nivel laboratorial como de campo, que permitirían llevar a cabo una vigilancia más eficiente. Estas herramientas tienen una aplicación directa y estratégica en la optimización de los programas de prevención y control de la enfermedad, contribuyendo significativamente a la mejora en la detección e implementación de medidas de bioseguridad.

Abstract

African swine fever (ASF) is caused by ASF virus (ASFV), and it is one of the most important infectious diseases affecting the pig industry and wild pigs. Over the last decade, outbreaks have been reported globally, leading to significant economic losses. This context has increased the urgency of its control, which is currently based, among other aspects, on mandatory and continuous surveillance. However, the development of a fully effective and safe vaccine is still needed to eradicate the disease. At present, the most promising strategy in the development of vaccine candidates against ASFV is the attenuation of the virus by deletion of specific genes (negative markers) and the use of reporter genes as positive markers. One of the most important characteristics of any vaccine candidate is the ability to differentiate between infected and vaccinated animals (DIVA). To date, none of the commercially available vaccines for ASFV have demonstrated this property at the serological level. The European Project VACDIVA was therefore set up to produce several vaccine candidates with potential DIVA characteristics.

The main objective of this thesis was to develop and design of a DIVA serological diagnostic assay for ASFV in domestic pigs and wild boar. For this purpose, the proteins encoded by the negative marker genes, 9GL, pEP153R and CD2v, as well as the reporter proteins, eGFP and mCherry, were produced. These proteins were expressed in a variety of expression systems, including bacteria, insect cells and mammalian cells. Subsequently, their antigenicity, in scenarios of infection or vaccination against ASFV, was studied.

Two of these proteins, pEP153R genotype II and eGFP, were selected for the development of a DIVA serological assay. This assay was designed to accompany the Lv17/WB/Rie1-ΔEP153R-ΔEP402R vaccine and its derivatives, containing the EP153R gene as a negative marker and the eGFP gene as a positive marker. In addition, the detection of antibodies against a control protein, p72 or p30, present in both the parental virus and the vaccine (constitutive marker), was included to monitor the immunisation in case of infection or vaccine response.

The main diagnostic platform used was ELISA. The assay was evaluated using serum samples from experimentally infected or vaccinated animals collected at different times. A total of 486 samples were analysed, being 313 from domestic pigs and 173 from wild boar. In addition, 384 serum samples from field animals from

ASF-free regions were tested to evaluate the specificity of the developed assay. Using the ELISA for detection of antibodies against the viral p72 protein as reference in this study, the pEP153R ELISA showed a sensitivity of 75.3% and a specificity of 99.9%. The lower sensitivity of the pEP153R ELISA was due to the delayed seroconversion against this protein, compared to the appearance of antibodies against the control protein p72. On the other hand, the eGFP ELISA showed a sensitivity of 90.0% and a specificity of 99.9%.

The assay was then adapted to a commercial format and was validated in national reference laboratories in several European countries, using samples from different matrices of infected and non-infected field animals. This commercial adaptation allowed the assay to be evaluated in a practical scenario, enhancing its potential use in disease control programs.

Subsequently, the DIVA assay was adapted to the multiplex platform ELISA-microarray, to allow the simultaneous detection of antibodies against all antigens from the DIVA ELISA (p72, p30, pEP153R genotype II and eGFP) in a single well. Two additional antigens, the ASFV pEP153R genotype I and the classical swine fever virus E2 proteins, were also included in the assay. The diagnostic parameters obtained in the sextuple assay were comparable to those obtained in the individual ELISAs, demonstrating the viability of this platform to facilitate the sample screening.

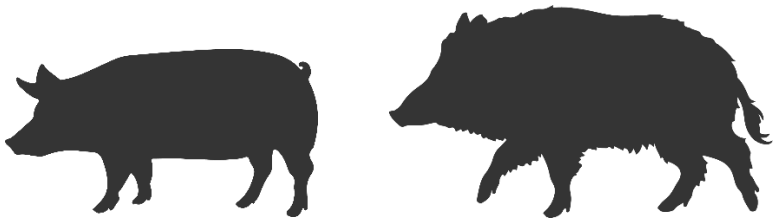
Finally, the DIVA assay was optimized for Lateral Flow Assay (LFA) technology, a platform that allows *in situ* diagnosis and is therefore particularly useful in the field. The results obtained showed good diagnostic parameters for the LFA detection of antibodies against eGFP (LFA eGFP), while the detection of antibodies against pEP153R was not possible in a rapid test format. However, the combination of the rapid test for the detection of antibodies against eGFP, together with the detection of antibodies against the p72 protein, could be a valuable tool in the monitoring of vaccinated animals.

The DIVA properties are essential in a vaccine and a companion assay is needed to allow differential diagnosis. The DIVA serological immunoassays developed in this work could be a useful tool for disease surveillance in areas where a vaccine with the EP153R gene as a negative marker and the eGFP gene as a positive marker is used.

In addition, a dual LFA device was validated to combine antigen and antibody detection in the same device for ASFV surveillance. The results of the field validation of this new test demonstrated that the combined rapid detection of antigen and antibodies against the virus can be a useful tool in the current control of the disease, especially in wildlife.

The results achieved in this thesis provide new data on antigens for the DIVA diagnosis of ASF. In addition, new diagnostic tools have been developed, both at laboratory and field level, that would allow a more efficient surveillance. These tools have a direct and strategic application in the optimising of disease prevention and control programmes, contributing significantly to improve detection and the implementation of biosecurity measures.

CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN



La **Peste Porcina Africana (PPA; en inglés, *African Swine Fever*, ASF)** es considerada una de las enfermedades más graves que afectan a las explotaciones de cerdos domésticos, debido a su alta letalidad. Por ello, es una de las patologías incluidas en la lista de notificación obligatoria ante la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA o WOAH, de sus siglas en inglés, *World Organisation for Animal Health*), estando las medidas de su control establecidas tanto a nivel de la Unión Europea (UE) como a nivel nacional [1]. La aparición y transmisión de esta enfermedad tiene graves repercusiones socioeconómicas, asociadas a pérdidas directas en las explotaciones afectadas, así como a pérdidas indirectas, relacionadas con la restricción de movimientos e implementación de medidas de control [2]. Estos efectos en la economía son especialmente significativos en la UE, ya que, el conjunto de sus países miembros ocupa la segunda posición en producción porcina a nivel mundial, después de China, y la primera en exportación de ganado porcino y productos derivados [3].

I. 1. DESCRIPCIÓN DEL VIRUS Y LA ENFERMEDAD

La PPA es una enfermedad vírica cuyo agente etiológico es el **virus de la PPA (vPPA)**, un virus nucleocitoplasmático de ADN de gran tamaño. El vPPA es el único virus que se clasifica dentro del género Asfivirus, de la familia Asfarviridae [4,5]. Su material genético es lineal, de doble cadena (170–190 kba) y contiene más de 150 marcos abiertos de lectura (ORF). El genoma consta de una región central conservada de aproximadamente 125 kb, así como de extremos variables que contienen cinco familias multigénicas (MGF), que contribuyen a la variabilidad entre aislados [6,7].

La **determinación del genotipo** de las cepas se realiza a partir de la secuenciación de un fragmento localizado en el extremo 3' terminal del **gen B646L**, que codifica la proteína mayoritaria de la cápsida externa, **p72** [7]. Actualmente, hay 24 genotipos identificados, aunque un estudio reciente ha demostrado que se podría reducir el número a únicamente 6, debido a errores durante el procesamiento de las secuencias [8], o a 7 "biotipos" si se tiene en cuenta el proteoma [9].

Además, se ha visto que la secuenciación de otras regiones variables puede ser una herramienta útil para distinguir subgrupos dentro de un mismo genotipo, lo que permite realizar un seguimiento de la propagación del virus y llevar a cabo

estudios epidemiológicos. Algunas de estas regiones génicas identificadas han sido la región intergénica entre los genes I73R e I329L, la región central variable del gen B602L o la secuencia completa del gen E183L [7] y, más recientemente, se han estudiado otras zonas génicas que también resultan útiles en el seguimiento de la evolución del virus [10].

Asimismo, dentro del **virión** (Figura I.1), el material genético del virus, o nucleoide, se encuentra rodeado por una matriz proteica [11,12], seguida de una cápsida interna compuesta de estructuras organizadas de los péptidos que conforman dicha matriz. Estos tres elementos constituyen el core del virus [4,13]. A continuación, se encuentran la membrana interna, la cápsida externa formada por subunidades de la proteína p72 [14] y, por último, una envuelta externa [15]. Las diferentes capas forman una partícula viral compleja, de forma icosaédrica y con un tamaño de aproximadamente 200 nm [16,17].

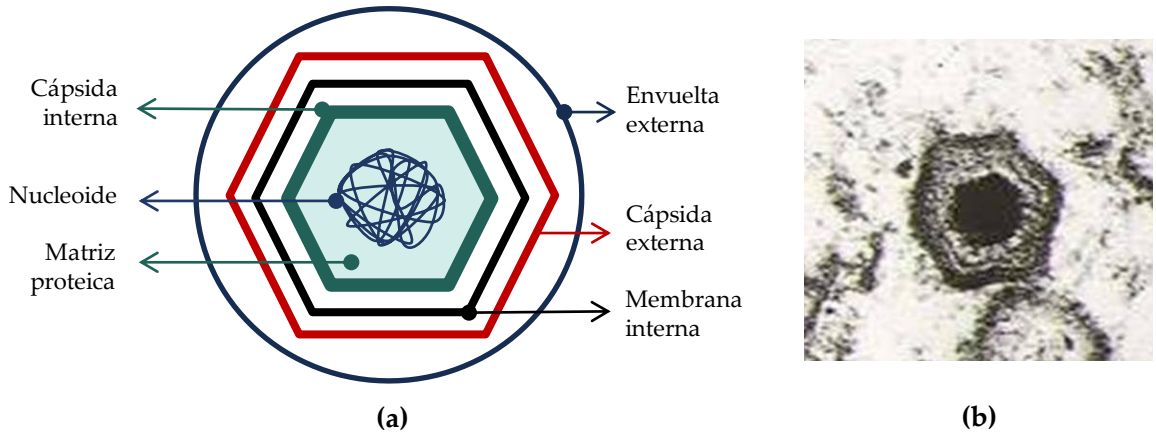


Figura I.1. Estructura del virión del virus de la peste porcina africana. (a) Esquema donde se indican las diferentes capas que forman el virión; **(b)** imagen del vPPA tomada al microscopio electrónico (fuente: CSIC-INIA-CISA **[18]**).

En cuanto a las **proteínas virales**, el virus consta de, al menos, 68 estructurales y otras 100 no estructurales, cuyas funciones no son conocidas en su totalidad [4,19]. Algunas de estas proteínas participan en la **evasión del sistema inmune del hospedador**, reduciendo la respuesta inmune innata, a través de la modulación de los niveles de citoquinas [20,21], o afectando la respuesta inmune específica. Un ejemplo de este último tipo de modulación es la proteína viral EP153R (pEP153R), que interacciona con el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC-I), pudiendo así influir negativamente en la activación de la respuesta inmune celular del hospedador [22].

Durante la infección, se ha demostrado que las respuestas inmunes humoral [23] y celular [24] participan en la protección frente al virus. Los anticuerpos específicos que se generan se utilizan de forma extendida en el diagnóstico de la PPA [25]. Algunas proteínas virales, como la p54, p30, p72 o el polipéptido viral pp62, se han identificado como altamente **inmunogénicas** [26,27]. Además, las tres primeras se han relacionado con el proceso de **neutralización** *in vitro* [28]. Sin embargo, cuando dichas proteínas se han usado como posible vacuna, en compañía de la p22, no se ha conseguido inmunidad protectora, indicando que la neutralización *in vitro* no está completamente relacionada con la que se produce *in vivo*, o que otras proteínas podrían participar también en el proceso [29]. Asimismo, estudios más recientes correlacionan el índice de neutralización con la tasa de supervivencia de los animales [30]. No obstante, a día de hoy, siguen necesarios más estudios sobre la inmunidad que se produce durante una infección del vPPA, para identificar qué procesos y proteínas virales son necesarios en la protección completa frente al virus [31].

Por otro lado, la proteína viral CD2v, que se localiza en la superficie de las células infectadas y en la envuelta externa del virión, participa en la unión de estos a los eritrocitos del hospedador [32,33]. Este fenómeno es característico del vPPA y se conoce como **hemadsorción (HAD)**. Además, se ha descrito que la pEP153R también podría tener un efecto en este fenotipo [34]. El análisis de la inhibición de la HAD se ha propuesto como método para la determinación del **serotipo del virus**, habiéndose identificado hasta el momento 8 diferentes [35].

Respecto a las **células diana** del vPPA, las principales son los monocitos y macrófagos porcinos [36], aunque otros tipos celulares también podrían tener un papel en la replicación del virus [37]. La entrada del vPPA a la célula puede ocurrir vía endocítica [38,39] o mediante macropinocitosis [40]. Si bien, a pesar de que estudios recientes sugieren el papel de diversas proteínas en la entrada del virus [41], aún no se han identificado con precisión las que participan en este proceso. Una vez dentro de la célula, el virus utiliza el sistema endosomal para desplazarse desde la membrana celular hacia la zona perinuclear del citosol, donde se libera el core del virus. Posteriormente, se lleva a cabo la replicación [42] y expresión génica en las factorías virales [43]. Las nuevas partículas ensambladas se excretan dentro de las primeras 24 horas posinfección mediante gemación o formación de cuerpos apoptóticos, adquiriendo en el proceso la envoltura externa viral [44,45].

I. 1. 1 Epidemiología

La PPA se diagnosticó por primera vez en Kenia en 1909 y no fue estudiada por Montgomery *et al.* hasta 1921 [5]. La enfermedad se propagó rápidamente por el continente africano, considerándose endémica en la región subsahariana desde entonces. Desde África, el vPPA se ha extendido a otros territorios en dos ocasiones independientes.

La **primera aparición del vPPA fuera de África** se documentó en 1957, cuando una cepa de genotipo I procedente del oeste de África ingresó a Portugal, probablemente a través de la alimentación de cerdos con restos de comida contaminada en granjas cercanas al aeropuerto de Lisboa [46]. Tras tres años sin casos reportados, en 1960 se registraron nuevos brotes en Lisboa, que se extendieron rápidamente por la Península Ibérica, varios países europeos y regiones de América Latina, incluyendo Brasil, Cuba, República Dominicana y Haití. En todas estas áreas afectadas, los brotes fueron controlados y la enfermedad logró erradicarse durante el siglo XX, salvo en la isla de Cerdeña, donde la PPA causada por virus de genotipo I persistió de forma endémica durante más de 40 años, hasta su erradicación en septiembre de este año [47,48].

La **segunda expansión del virus** ocurrió en 2007, cuando se aisló un vPPA virulento de genotipo II procedente del este de África en las cercanías del puerto de Poti en Georgia [49]. La enfermedad se transmitió rápidamente por la región Caucásica y Rusia, donde actualmente se considera endémica. Desde entonces, el virus ha continuado propagándose hacia el este de Europa, afectando tanto a poblaciones de cerdos domésticos como de jabalíes, siendo estos últimos los principales afectados en la mayoría de los países europeos. Desde 2018, el vPPA ha hecho incursiones significativas en nuevos territorios, como Bélgica (2018) y Alemania (2020). En 2018 se notificó por primera vez en China, el mayor productor porcino a nivel mundial, expandiéndose rápidamente a países asiáticos vecinos, entre ellos Vietnam. Hasta junio de 2024, 20 países se han visto afectados por el vPPA en Asia, lo que ha provocado enormes pérdidas económicas en muchas regiones asiáticas. En 2019, se registró el primer brote de la enfermedad en Oceanía, y en 2021 reapareció en América (República Dominicana y Haití), 40 años después de la primera incursión en este continente. En 2022, se reportó en la península italiana, desde donde el genotipo II ha hecho su primera incursión a la isla de Cerdeña en 2024. En los últimos dos años, la enfermedad ha sido notificada en cinco nuevos países europeos: Suecia, Bosnia-Herzegovina, Croacia, Albania y

Montenegro, sumando un total de 23 países en Europa que han declarado la enfermedad, lo cual reafirma que el virus continúa expandiéndose [50]. En esta expansión, el jabalí europeo ha sido el principal afectado, representando la mayoría de los casos frente a los cerdos domésticos, lo cual representa un desafío significativo para el control y erradicación de la PPA en Europa y otras regiones afectadas. Durante esta segunda epidemia, todos los vPPA aislados se han clasificado dentro del genotipo II; sin embargo, recientemente se han identificado cepas del genotipo I en China, lo que ha dificultado aún más la erradicación de la enfermedad en el país asiático [51].

El vPPA infecta a los suidos y mantiene diferentes **ciclos de transmisión** relacionados con los ecosistemas, incluyendo cerdos domésticos (*Sus scrofa domesticus*), diferentes especies de suidos salvajes y garrapatas del género *Ornithodoros* (Figura I.2). El ciclo selvático se ha descrito únicamente en el sur y este de África; y en él participan el vector *O. moubata* y los suidos salvajes africanos jóvenes (principalmente, las especies *Phacochoerus africanus* y *Potamochoerus larvatus*), ya que los adultos no presentan suficiente carga vírica en sangre para la posible transmisión del virus [52]. Por otro lado, también se han descrito ciclos en los que están involucradas únicamente las garrapatas, o en el que participan tanto la garrapata como el cerdo. Este último fue relevante en la Península Ibérica durante el siglo XX, y sigue teniendo en la actualidad un papel importante en África [52,53]. Sin embargo, la transmisión entre garrapatas y suidos no se ha observado en Europa central o en los países caucásicos [54,55].

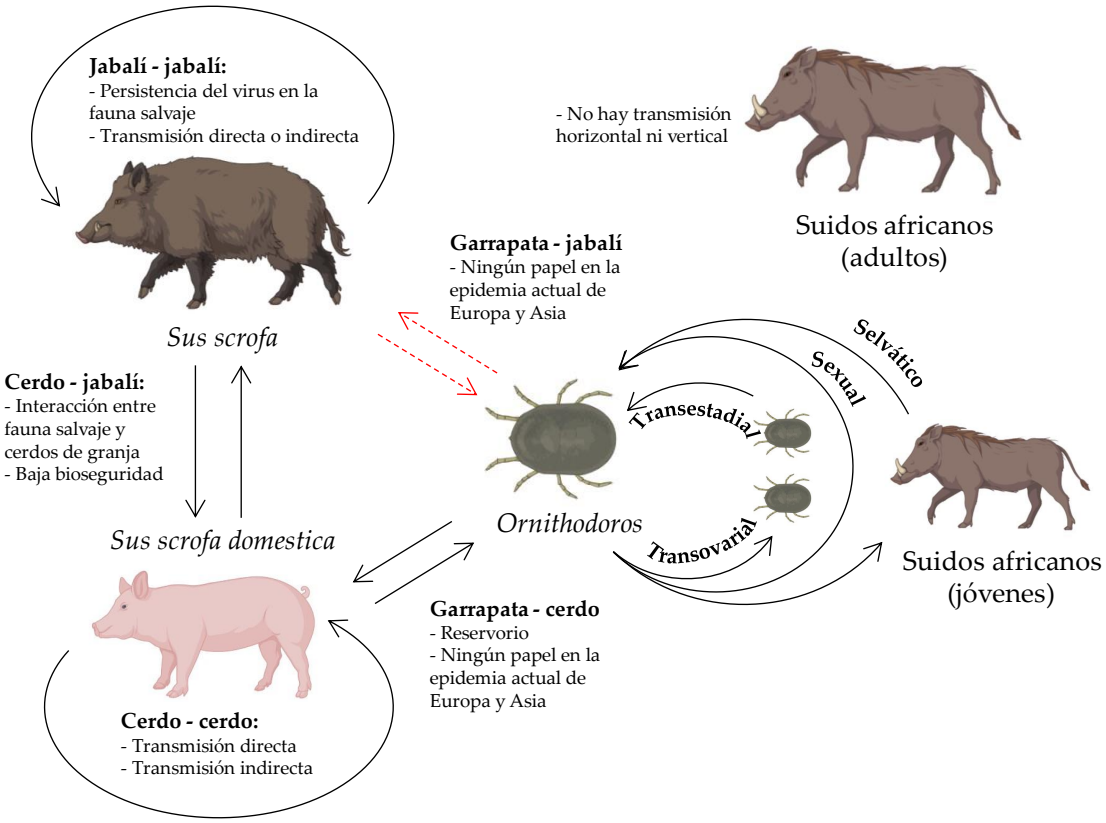


Figura I.2. Hospedadores del virus de la peste porcina africana. Suidos africanos: principalmente las especies *Phacochoerus africanus* (facóquero) y *Potamochoerus larvatus* (potamóquero). Imagen adaptada de Gaudreault *et al.*, 2020 [52] y creada con BioRender.com.

Finalmente, en el continente euroasiático los ciclos con relevancia en la epidemia actual son los que implican únicamente a cerdos domésticos y jabalíes euroasiáticos (*Sus scrofa*), pudiendo ocurrir la transmisión de manera bidireccional, especialmente en granjas con baja bioseguridad. La transmisión no solo se da de manera directa, es decir, entre un animal infectado y otro sano, siendo común en el caso de los jabalíes el contagio por contacto con cadáveres de animales infectados, sino también puede ocurrir siguiendo una vía indirecta. Esta última vía implica la transmisión a través de la alimentación de los animales con restos de carne infectada o fómites (instalaciones, vehículos, ropa, etc.) [54].

I. 1. 2 Patogenia

La **vía más común de entrada** del vPPA en el hospedador es la oronasal, aunque existen otras rutas alternativas como la conjuntiva, los tractos genitales, abrasiones de la piel o las mordidas de garrapatas infectadas. Si el virus entra al

suido a través de la vía oronasal, su **replicación primaria** ocurre en las células diana localizadas en los ganglios linfáticos mandibulares y de las amígdalas, mientras que, si entra por una vía alternativa, la replicación inicial se localiza en los ganglios linfáticos periféricos más cercanos. Después de la replicación primaria, el vPPA se transporta a través de la sangre o la linfa hasta los **órganos secundarios** de replicación, tales como el bazo, otros ganglios linfáticos, la médula ósea, el hígado, pulmón y/o riñón, en los que aumenta rápidamente la carga viral [56,57]. La infección generalizada de estos órganos ocurre a partir de los 3 días posinfección (dpi) y normalmente coincide con la aparición de fiebre [56].

La **manifestación clínica** de la PPA depende no solo de la virulencia de la cepa del virus que infecta al animal, o lo que es lo mismo, de la patogenicidad asociada a la cepa, sino también del estado de salud y de la edad del suido en el momento de la infección. A nivel experimental, se ha visto que otros factores como la dosis y la vía de entrada están estrechamente relacionados con la aparición de síntomas [56,58–60]. Los síntomas van desde fiebre alta, postración y diarrea, hasta hemorragias en la piel, entre otros.

Según la gravedad y aparición de los síntomas, se distinguen 4 formas clínicas que varían desde una forma hiperaguda, aguda o subaguda hasta una infección crónica (Tabla I.1). Las cepas de alta virulencia están normalmente asociadas a una forma hiperaguda o aguda, mientras que las cepas de moderada virulencia pueden causar un cuadro clínico agudo, subagudo o incluso crónico. Si bien, la forma crónica está normalmente asociada a cepas de baja virulencia, comúnmente denominadas atenuadas, que también pueden producir una manifestación clínica con síntomas inespecíficos, fácilmente confundibles con otras enfermedades porcinas. Además, se ha descrito la existencia de una infección no aparente, que podría estar relacionada con animales que sobreviven a la infección. Estos animales pueden excretar el virus incluso hasta los 70 dpi [61] y su papel en la epidemiología actual es objeto de controversia [61,62].

Asimismo, se ha descrito que las lesiones macroscópicas observadas en las necropsias de los animales sacrificados son dependientes de la forma clínica y del aislado del virus [7]. Las lesiones incluyen fundamentalmente el bazo agrandado, así como hemorragias en órganos tales como los ganglios linfáticos renales y gastrohepáticos, y en el riñón y vejiga, entre otras [7,56].

Tabla I.1. Descripción de las formas clínicas de la peste porcina africana.

Forma clínica	Hiperaguda	Aguda	Subaguda	Crónica
Virulencia de la cepa	Alta (dosis altas)	Alta o moderada	Moderada	Moderada o baja
Duración de la manifestación clínica	1–3 dpi	3–8 dpi	7–20 dpi	Más de 1 mes
Muerte del animal (dpi)	Antes de los 4 dpi	A los 6–9 dpi o hasta los 14 dpi, dependiendo de la virulencia de la cepa	7–22 dpi	2–15 meses
Letalidad	Hasta 100 %	90–100 %	30–70 %	Esporádico, menos del 30 %

dpi: días posinfección; Fuente: [7,56].

I. 2. DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD

La identificación de los síntomas clínicos asociados a la PPA es el primer indicio de que la enfermedad está circulando en una población porcina. Sin embargo, el diagnóstico diferencial es complejo, debido a la similitud con los síntomas de otras enfermedades, tales como la peste porcina clásica (PPC), el síndrome de dermatitis y nefropatía porcina y el síndrome respiratorio y reproductivo porcino. Además, en el caso de la PPC, las lesiones *post mortem* son indistinguibles a las producidas por el vPPA, siendo indispensable un diagnóstico diferencial usando técnicas de laboratorio [63].

La detección de un animal infectado en el laboratorio se puede realizar mediante un **diagnóstico directo**, en el que se detecta al agente patógeno mediante su aislamiento o la detección de alguno de sus componentes (genoma viral o antígenos virales), y/o mediante un **diagnóstico indirecto**, que conlleva la detección de anticuerpos específicos frente al agente infeccioso [7]. Actualmente circulan en el campo cepas de diferente virulencia, por lo que se recomienda combinar métodos directos e indirectos para la identificación de todas las formas clínicas de la enfermedad (Figura I.3) [64,65].

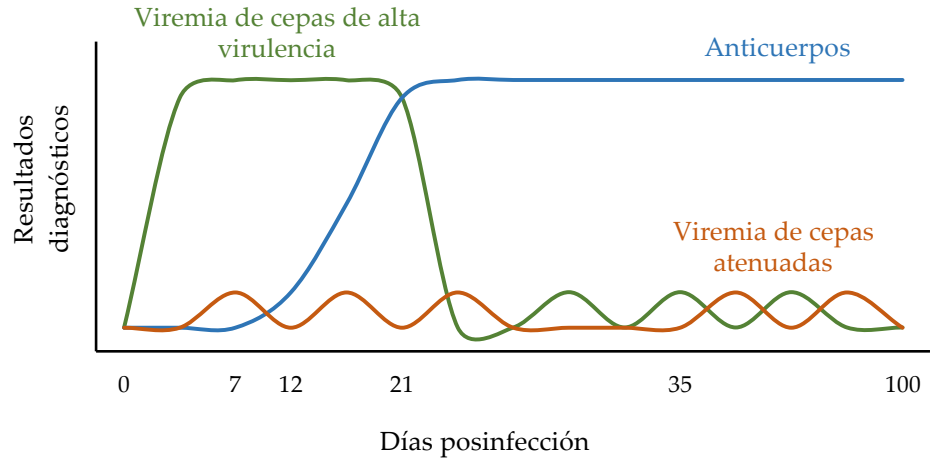


Figura I.3. Cinética del nivel de viremia y anticuerpos durante la infección del virus de la peste porcina africana. En el eje de ordenadas, se representan los resultados diagnósticos de viremia o anticuerpos específicos frente al virus, respecto a los días posinfección, representados en el eje de abscisas. Imagen adaptada del Laboratorio Europeo de Referencia de la PPA [66].

La detección del agente causal en sangre (viremia) se considera una herramienta fundamental para el diagnóstico de la PPA, ya que en formas agudas o subagudas se produce una viremia alta y prolongada hasta la muerte del animal. Sin embargo, solo las técnicas directas más sensibles son capaces de detectar la viremia que se produce durante los primeros días después de la infección cuando la carga viral es más baja, o la viremia intermitente que se ha descrito en los animales con una infección crónica, producida por cepas atenuadas. En esta última situación, la detección de anticuerpos específicos frente al vPPA tiene un papel clave [7,25] debido a que, al no haber vacuna, la presencia de los mismos indica que el animal está o ha estado en contacto con el virus [7]. Además, la detección de anticuerpos resulta también fundamental para la identificación de animales que han sobrevivido a infecciones agudas y subagudas, permitiendo así un análisis más completo de la respuesta inmunitaria en diversas manifestaciones de la enfermedad [25].

Asimismo, para hacer un diagnóstico adecuado, es fundamental realizar una toma de muestra apropiada. La OMSA recomienda recoger muestras de sangre con anticoagulante EDTA, de suero o de tejido (bazo, ganglios linfáticos, hígado, amígdala, corazón, pulmón, riñón y médula ósea) [7]. Para la detección de anticuerpos en muestras de tejido, se emplea un exudado, salvo en el caso de la médula ósea, que debido a sus características requiere la realización de un protocolo especial para la obtención de un homogeneizado [67]. Además, en los casos en los que la recolección de sangre se realiza en sitios remotos o donde no se cuenta con

condiciones óptimas para su conservación, es conveniente recoger la muestra en hisopos o papel de filtro [7,68].

Las técnicas de detección directa o indirecta que recomienda la OMSA para un **diagnóstico laboratorial** adecuado, se describen a continuación:

- **Diagnóstico directo**:

Para la detección del agente causal, la técnica más utilizada actualmente es la **reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**, debido a su sensibilidad, especificidad y rapidez. La identificación del material genético también se denomina comúnmente **diagnóstico molecular**. A día de hoy, se han desarrollado distintas PCR para la detección del genoma del vPPA, siendo tres las recomendadas por la OMSA: King *et al.* [69], Fernández-Pinero *et al.* [70] y Agüero *et al.* [71]. Las dos primeras son PCR a tiempo real (qPCR), mientras que la tercera es una PCR a tiempo final y presenta una sensibilidad menor que las dos primeras para la detección de los virus de genotipo II que circulan en la epidemia actual [25]. Además, hay otras PCR validadas que también se han incorporado en el Manual de la OMSA [72], siendo algunas de ellas comerciales [73]. La mayoría de estas PCR tienen como diana el gen viral B646L. Sin embargo, debido a la aparición de múltiples aislados de baja virulencia del vPPA y al uso de vacunas basadas en virus modificados en algunas regiones, recientemente la OMSA también recomienda la aplicación de otras PCR. Estas PCR permiten la diferenciación entre virus *wild type* y vacunas con uno o varios genes delecionados, entre los que se incluyen los siguientes: MGF360/505 y EP402R [74]; I177L [75]; o MGF360-2L [75].

El diagnóstico directo también puede realizarse mediante la **detección de proteínas virales**, utilizando el ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA) o la inmunofluorescencia directa (IFD). Respecto a los **ELISA**, se han desarrollado varios ensayos *in-house*, o puestos a punto en cada laboratorio, que actualmente no están en uso, habiendo actualmente un único ELISA disponible comercialmente (INgezim® PPA DAS, GSD Madrid) [25]. En relación a la **IFD**, se trata de un ensayo para detectar antígenos virales en frotis o secciones de órganos, utilizando un anticuerpo conjugado a un fluoróforo [63,76]. Ambas técnicas de detección de proteínas virales solo se recomiendan en formas agudas de la enfermedad, cuando todavía no se ha desarrollado una repuesta humoral frente al virus. Esto es debido a que cuando aparecen anticuerpos, se pueden generar complejos antígeno-anticuerpo que dan lugar a resultados falsos negativos [63].

Además, la detección de proteínas virales depende de manera directa del estado de conservación de la muestra [7]. Por tanto, este tipo de técnicas debe ser usada siempre en compañía de otras técnicas de diagnóstico directo y/o indirecto [25].

Por último, el vPPA puede ser identificado mediante el **ensayo de HAD**. Para ello, es necesario el aislamiento del virus en cultivos primarios, empleando macrófagos porcinos alveolares (células PAM) o monocitos porcinos periféricos (células PBMC) [77]. Tras la adición de eritrocitos porcinos en el cultivo, un resultado positivo se muestra como la unión de los glóbulos rojos a las células infectadas, dando lugar a estructuras que se denominan rosetas e indican la presencia del vPPA. La mayoría de los aislados del vPPA tienen fenotipo HAD [7], pero algunas cepas pueden producir únicamente un efecto citopático, siendo necesaria la detección del agente infeccioso utilizando otra técnica de diagnóstico directo.

Las características de todas las técnicas descritas anteriormente para la detección del agente causal se resumen en la Tabla I.2

Tabla I.2. Características de las técnicas de diagnóstico directo.

Diagnóstico directo				
Ensayo	**Sensibilidad**	**Especificidad**	**Coste**	**Uso principal**
PCR	+++	++	++	Cribado
ELISA de antígeno	+	+++	+	Cribado
IFD	++	+++	+++	Confirmatorio
Ensayo HAD	++	+++	+++	Confirmatorio

IFD: inmunofluorescencia directa; HAD: hemadsorción. Escala cualitativa: de menos (+) a más (+++).

- **Diagnóstico indirecto:**

Respecto a las herramientas de laboratorio recomendadas por la OMSA para el diagnóstico indirecto o serológico, la tecnología **ELISA** es la que presenta mayor capacidad de procesamiento para el análisis de un elevado número de muestras, pudiendo incluso adaptarse a la automatización con los equipos adecuados. Estas características la convierten en la técnica de cribado más utilizada en la actualidad, con la posibilidad de emplear tanto un ELISA *in-house* como uno comercial [72]. Los ELISA *in-house* generalmente utilizan como antígeno el virus completo, mientras que los comerciales, usan proteínas virales antigénicas en su forma nativa o

recombinante. Los ELISA disponibles actualmente en el mercado se detallan en la Tabla I.3, siendo el INgezim® PPA Compac el de uso más extendido dentro de la UE [25].

Tabla I.3. ELISA comerciales de detección de anticuerpos frente al vPPA disponibles actualmente en el mercado.

Nombre comercial	Empresa	Formato	Antígenos	Muestra recomendada
INgezim® PPA Compac	GSD Madrid	Bloqueo	p72	Suero no hemolizado
INgezim® ASFV-R	GSD Madrid	Indirecto	p30, pCP312R	Sueros hemolizados, sangre fresca o en papel de filtro, exudado de bazo
ID Screen® ASF Competition ELISA	IDvet	Bloqueo	p30	Suero, plasma
ID Screen® ASF Indirect ELISA	IDvet	Indirecto	p30, p62, p72	Suero, plasma, jugo de carne y sangre en papel de filtro
ID Screen® ASF Oral Fluids (Biwell)	IDvet	Indirecto	p30, p62, p72	Fluidos orales
SVANOVIR® ASFV-Ab	Svanovir	Indirecto	p30	Suero y plasma

En ocasiones, cuando se analizan muestras de suero hemolizadas, sangres mal conservadas o tejidos, los ELISA pueden dar resultados falsos positivos [78]. Por tanto, se debe verificar el resultado positivo usando un método adicional confirmatorio. La OMSA recoge tres **ensayos confirmatorios**: *immunoblotting* (**IB**), inmunofluorescencia indirecta (**IFA**) y el ensayo de inmunoperoxidasa indirecta (**IPT**). Todos estos ensayos están basados en la detección de anticuerpos específicos frente al vPPA utilizando como antígeno un cultivo de células infectadas, a excepción del IB, en el que también se puede emplear una combinación de proteínas recombinantes virales [7,76,79,80]. En el caso de la IPT y la IFA, su aplicabilidad se extiende a una amplia variedad de muestras, incluyendo sangre, tejidos y fluidos porcinos y, debido a que presentan una alta sensibilidad durante los tiempos tempranos de la infección, permiten analizar con precisión el momento de aparición de anticuerpos [72,78]. De este modo, ambas técnicas no solo actúan como técnicas confirmatorias sino también esenciales en el diagnóstico de campo, ya que proporcionan un control más exhaustivo de la PPA. Sin embargo, en comparación con el ELISA, son técnicas más costosas, laboriosas y requieren personal más

especializado, además de necesitar un laboratorio de nivel de bioseguridad 3 (BSL-3) donde poder crecer el virus, o tener disponible la tecnología de proteínas recombinantes [72].

Las características de las técnicas descritas anteriormente para la detección de anticuerpos se indican en la Tabla I.4.

Tabla I.4. Características de las técnicas de diagnóstico indirecto.

Diagnóstico indirecto				
Ensayo	**Sensibilidad**	**Especificidad**	**Precio**	**Uso principal**
ELISA	+	+*	+	Cribado
IB	++	+	+++	Confirmatorio
IPT/IFA	+++	+	+++	Confirmatorio

*en muestras de tejido, la especificidad es más baja que en el resto de las técnicas. IB: *immunoblotting*; IPT: ensayo de inmunoperoxidasa indirecta; IFA: inmunofluorescencia indirecta. Escala cualitativa: de menos (+) a más (+++).

En situaciones donde las técnicas de laboratorio no son posibles por falta de recursos, las **plataformas de diagnóstico rápido en campo** cobran importancia para detectar un brote de la enfermedad. Los ensayos rápidos están basados en la tecnología de inmunocromatografía de flujo lateral, en membranas de nitrocelulosa (LFA, de sus siglas en inglés, *Lateral Flow Assay*). Aunque estos ensayos no están certificados y validados por la OMSA, existen kits comerciales para la detección de antígenos o anticuerpos frente al vPPA. Estos ensayos, además de ofrecer un resultado a los 10–20 min, son fáciles de emplear y no requieren personal especializado. En cuanto a los kits de detección de antígeno, hay 4 disponibles en el mercado, distribuidos por las empresas GSD Madrid, Bionote, PenCheck™ y Shenzhen Lvshiyuan Biotechnology Co, siendo el primero (INgezim® ASF CROM Ag, GSD Madrid) el que presenta mejores parámetros diagnósticos [81]. Respecto a los ensayos rápidos de detección de anticuerpos, hay dos disponibles: INgezim® PPA CROM Anticuerpo (GSD Madrid) y GDX70-2 Herdscreen® ASF Antibody (Global Dx), los cuales presentan parámetros diagnósticos similares [81].

I. 3. CONTROL Y VIGILANCIA DE LA ENFERMEDAD

La PPA es una de las enfermedades porcinas de declaración obligatoria en la UE [82], dado su alto riesgo para la salud animal y su impacto negativo en la economía del sector. Actualmente, debido a la falta de un tratamiento específico, el control de la enfermedad se basa en: **(1)** medidas de prevención; **(2)** una vigilancia adecuada, basada en la identificación temprana de síntomas clínicos compatibles y soportada por las técnicas de diagnóstico en el laboratorio; y **(3)** la implementación de medidas estrictas de contención.

(1) Medidas de prevención: consisten en la toma de acciones para evitar la propagación del virus mediante la comunicación, concienciación y bioseguridad en explotaciones porcinas, así como en el sector cinegético [83].

(2) Vigilancia: esta puede ser pasiva o activa. La **vigilancia pasiva** se basa en la observación de los animales para la identificación de síntomas o lesiones *post mortem* compatibles con la PPA, mientras que la **vigilancia activa**, radica en el muestreo de animales aparentemente sanos. En granjas porcinas la vigilancia pasiva es obligatoria y supone una herramienta fundamental en el control de la enfermedad, mientras que la activa no está incluida en la legislación europea actual y solo se implementa cuando es considerada necesaria por la autoridad nacional competente. Por otro lado, en poblaciones de jabalíes, se hace vigilancia pasiva en animales muertos o enfermos, mientras que se lleva a cabo una vigilancia activa generalmente basada en la caza [7].

Las muestras recogidas durante la vigilancia son enviadas a los laboratorios competentes, que tratan la muestra siguiendo el flujo recomendado por la OMSA y el Laboratorio de Referencia de la Unión Europea (EURL) para la PPA (CSIC-CISA-INIA) (Figura I.4). En primer lugar, la muestra se analiza por PCR y, en caso de no estar disponible esta técnica, se puede aislar directamente el virus o aplicar otra técnica de detección del agente causal. Si se obtiene un resultado positivo por cualquiera de ellas, es recomendable determinar el genotipo del virus y debe notificarse inmediatamente a las autoridades competentes. Cuando se trata del primer caso positivo en una región, el resultado se confirma con una segunda técnica de diagnóstico directo y/o indirecto, siendo recomendable el aislamiento del virus [66,72].

Por otro lado, si se obtiene un resultado negativo en PCR, se considera la muestra libre de PPA y se puede realizar opcionalmente un diagnóstico diferencial de otras enfermedades porcinas. Además, se recomienda realizar en paralelo la detección de anticuerpos. Para ello, en primer lugar, las muestras se criban mediante ELISA y si hay un resultado positivo, se debe realizar un ensayo confirmatorio (IFA, IPT o IB). Un resultado positivo a anticuerpos también debe notificarse inmediatamente a las autoridades y se debe comprobar si se trata de una infección activa [66,72].

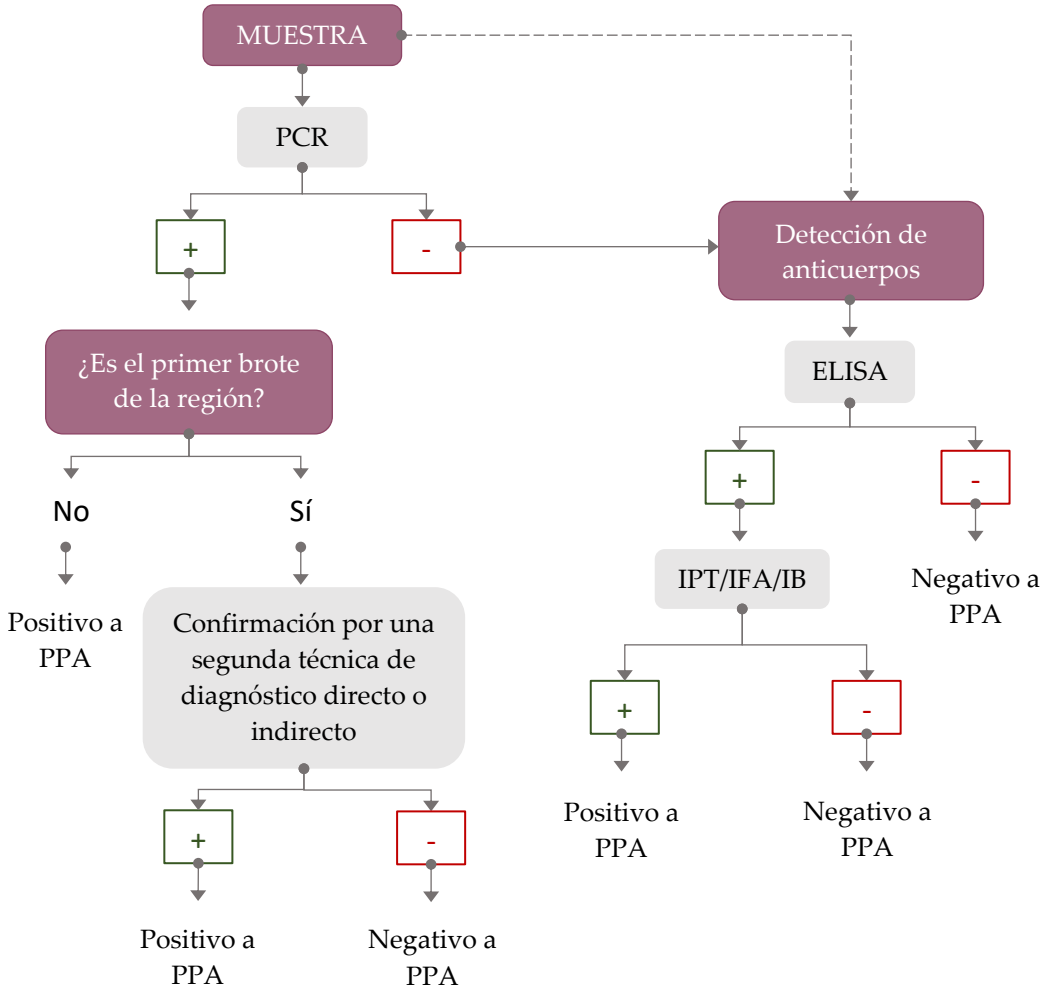


Figura I.4. Secuencia de técnicas de laboratorio para diagnosticar la presencia de la peste porcina africana (PPA).

(3) Medidas de contención. Se trata del último punto del control de la PPA. En el caso de las explotaciones de **cerdos domésticos**, cuando se han identificado síntomas o lesiones *post mortem* compatibles, estas deben quedar bajo vigilancia oficial hasta que se obtenga el diagnóstico confirmativo del laboratorio.

Las medidas más importantes en caso de sospecha incluyen hacer un censo de los cerdos afectados, prohibir la salida de cualquier producto y restringir el movimiento de animales, personas y vehículos. Si el diagnóstico se confirma, todos los cerdos de la explotación deben ser sacrificados inmediatamente y se debe tomar un número suficiente de muestras para futuras investigaciones epidemiológicas. La explotación también debe seguir un protocolo de limpieza y desinfección. Además, alrededor del lugar del brote se delimitan zonas donde se refuerza la vigilancia y se restringe también el movimiento [84].

Si la muestra positiva detectada procede de un **jabalí**, las medidas de contención también implican la segmentación de diferentes zonas y la restricción de los desplazamientos, pudiendo ser útil el uso de vallas para delimitar el perímetro de cada zona, especialmente la más cercana al caso positivo detectado. El diámetro de cada zona restringida dependerá de las características geográficas donde se haya dado el brote. Las medidas de control estarán basadas en la intensificación de la caza, la vigilancia, tanto en granjas como en jabalíes, y la retirada de cadáveres en las zonas delimitadas [85].

Además, el movimiento y el comercio de animales entre zonas afectadas y libres de PPA también está regulado, siendo las medidas dependientes de la situación del problema en cada región [86].

I. 4. VACUNAS

A día de hoy, no hay ninguna vacuna para la PPA registrada en Europa [72]. Según las indicaciones de la UE, una vacuna no solo debe ser eficaz, protegiendo frente a la enfermedad mediante la generación de una respuesta inmune protectora, sino también: **(1)** debe ser **segura**, es decir, no causar efectos secundarios en los animales vacunados, en aquellos que puedan estar en contacto con ellos, ni en el medio ambiente; **(2)** la respuesta inmune producida por la vacuna debe permitir **diferenciar animales infectados de vacunados** (aproximación DIVA, de sus siglas en inglés *Differentiating Infected from Vaccinated Animals*); **(3)** debe ofrecer **protección cruzada**, es decir, protección no solo contra una cepa del virus, sino frente a todas las de su mismo genotipo o idealmente frente a todos los genotipos; **(4)** debe producirse en una línea celular estable, que permita su producción a gran escala a bajo costes, de forma reproducible y cumpliendo altos estándares de calidad; y por

último, **(5)** su formulación debe ser compatible con campañas de vacunación de la fauna silvestre, para lograr el control y erradicación de la enfermedad [31,87].

Aunque ninguna vacuna para la PPA ha sido aprobada para su uso en la UE, en 2022, las empresas vietnamitas NAVETCO y AVAC, desarrollaron dos vacunas vivas atenuadas frente al vPPA: **NAVET ASFVAC y AVAC ASFV Live**, respectivamente. Este desarrollo se realizó en colaboración con científicos del Departamento de Agricultura de Estado Unidos (en inglés, *United States Department of Agriculture*, USDA) [88]. Estas vacunas han sido utilizadas en condiciones de campo en granjas de Vietnam, República Dominicana y Filipinas. Sin embargo, su uso fue suspendido durante algunos meses debido a muertes repentinas de animales vacunados [89]. A pesar de esto, ambas vacunas están autorizadas en el país productor y, en el caso de AVAC ASFV Live, también ha recibido autorización recientemente en Filipinas [90]. No obstante, ambas vacunas no cumplen con alguno de los requisitos de la UE mencionados anteriormente, destacando la falta de propiedades DIVA serológicas, lo que lleva a que su aplicación tampoco sea recomendada por la OMSA.

La dificultad para obtener una vacuna frente al vPPA está asociada principalmente a que no se conocen todos los antígenos que participan en la protección frente al virus, así como a su capacidad para modular la respuesta inmune del hospedador. A pesar de estas limitaciones, hay múltiples laboratorios investigando para conseguir una vacuna frente a la enfermedad [31,87,91], pudiéndose agrupar sus trabajos según el **tipo de vacuna**, como se describe a continuación:

- **Vacunas inactivadas:**

Están basadas en el vPPA inactivado mediante el uso de agentes físicos, como la radiación gamma [92], o químicos, tales como detergentes o agentes alquilantes [93–95]. Sin embargo, estas estrategias, incluso en compañía de adyuvantes o de altas dosis de inoculación, no inducen protección, a pesar de desencadenar una respuesta humoral. Asimismo, en algunos casos, se ha visto que no son capaces de inducir una respuesta celular citotóxica específica [31]. Según los datos disponibles hasta la fecha, el desarrollo de una vacuna eficaz y protectora basada en la inactivación del vPPA no parece una opción viable [96].

- **Vacunas de subunidades y vectores virales:**

Las vacunas de subunidades están basadas en la inoculación de algunos componentes del virus. Por tanto, al no poder replicarse en el hospedador, no presentan riesgo de diseminación viral y posible reversión a la virulencia. En el caso del vPPA, las predominantes han sido las constituidas por **proteínas o ADN plasmídicos recombinantes**. Sin embargo, ninguna de las vacunas desarrolladas hasta la fecha ha dado lugar a una protección completa frente a la enfermedad. Este resultado es debido, en gran parte, a que no se conoce la totalidad de las proteínas virales que son necesarias para inducir una respuesta inmune capaz de neutralizar al virus [31]. A pesar de ello, muchos grupos continúan investigando para conseguir una vacuna protectora basada en esta estrategia. En este contexto, en uno de los estudios más recientes, se han inmunizado animales con una combinación de múltiples proteínas y ADN virales; sin embargo, a pesar de inducir anticuerpos neutralizantes e interferón gamma [97], los cerdos domésticos no estuvieron protegidos frente al desafío con una cepa virulenta [98]. Por otro lado, las estrategias basadas en **vectores virales** tampoco han ofrecido suficiente nivel de protección, independientemente del vector no replicativo e inocuo utilizado. Este tipo de vacunas es capaz de desencadenar una respuesta inmune humoral o incluso celular [99], pero sin generar protección, ya bien sea porque los animales no han conseguido sobrevivir [100,101], o porque han desarrollado síntomas tras el desafío con una cepa virulenta del vPPA [102].

En resumen, las vacunas basadas en ADN y péptidos inducen respuestas inmunitarias antivirales, incluyendo anticuerpos neutralizantes y respuesta inmune celular específica frente al virus, pero muestran solo una protección baja o parcial después del desafío con una cepa virulenta. Sin embargo, hay un gran interés en continuar con su desarrollo, debido a que presentan ventajas frente a las vacunas vivas atenuadas en cuanto a seguridad.

- **Vacunas vivas atenuadas** (LAV, de sus siglas en inglés, *Live attenuated vaccines*):

Las LAVs suponen la estrategia más utilizada en las últimas décadas para la producción de vacunas, debido a sus resultados prometedores en la protección de los animales [103]. La atenuación de estas vacunas puede ser natural o haberse producido por métodos *in vitro*. Además, más recientemente se ha descrito que la

atenuación puede producirse por acción de la temperatura y, aunque hay solo un estudio disponible, los resultados son prometedores [104].

En el caso de las **vacunas vivas atenuadas de forma natural**, se han identificado varios aislados de vPPA que muestran menor virulencia en animales experimentales, entre los cuales destacan los aislados OURT 88/3, NH/P68 y, de manera especial, Lv17/WB/Rie1 [59,105,106]. Esta última cepa, de genotipo II y aislada en el EURL para la PPA partiendo de una muestra procedente de un jabalí capturado en 2017 en Letonia, ha sido clave en el desarrollo de prototipos vacunales debido a sus características atenuadas y su fenotipo no hemadsorbente, lo cual la hace particularmente atractiva como candidato vacunal [106].

Sin embargo, aunque la protección de cada vacuna está relacionada con la dosis y la ruta de administración, en general, todas ellas causan un cuadro clínico crónico o inespecífico. Debido a ello, se ha intentado mejorar la atenuación del virus mediante **métodos *in vitro***, que implican pases celulares sucesivos o técnicas específicas de modificación genómica para conseguir la deleción de genes virales.

En la generación de cepas atenuadas por **pases celulares sucesivos**, la deleción de genes ocurre de forma espontánea debido a la adaptación del vPPA a su crecimiento en líneas celulares. En los inicios fue bastante común esta estrategia. Así, en los 60's se utilizaron virus atenuados por múltiples pases en diferentes líneas celulares, aportando protección frente a cepas virulentas, pero generando síntomas asociados a formas crónicas de la enfermedad y una viremia prolongada [103]. A pesar de estos resultados, se continuaron haciendo estudios utilizando este tipo de estrategia de atenuación, pero sin obtener mejores resultados [107,108].

En las últimas décadas, debido al avance de las técnicas de modificación genómica basadas en recombinación homóloga y la tecnología CRISPR-Cas9, el desarrollo de las vacunas se ha centrado en la atenuación de las cepas mediante **deleción de genes virales específicos** [103]. La aproximación más extendida hasta la fecha ha sido la deleción de la secuencia completa de un gen viral y su sustitución por un gen reportero [109]. De este modo, se han desarrollado muchas vacunas candidatas, basadas en la deleción de genes que han sido relacionados con la virulencia del virus, tales como el B119L, DP96R, EP402R o DP148R, así como diferentes genes de la MGF [110]. En el caso de las dos vacunas comercializadas por compañías vietnamitas, ambas son un ejemplo de atenuación causada por la deleción de genes específicos en la cepa virulenta Georgia 2007 [111,112]. Sin embargo, una limitación de este tipo de vacunas es que se ha observado que la

deleción de un mismo gen puede tener un efecto diferente en la seguridad, dependiendo de la cepa parental utilizada, lo que evidencia la importancia del resto del genoma en la eficacia de un candidato vacunal [113,114].

Las características de las diferentes estrategias de obtención de vacunas se muestran en la Tabla I.5.

Tabla I.5. Características de los distintos tipos de vacunas candidatas frente al vPPA.

	Inacti-vadas	Vacunas de subunidades			Vacunas vivas atenuadas		
		Antí-genos	ADN	Vector vírico	Natural-mente	Pases sucesivos	Deleción de genes
Infecciosa				✓ (inocua)	✓	✓	✓
Compatible con DIVA		✓	✓	✓			✓
Coste/ complejidad de producción	Baja	Alta	Alta	Alta	Baja	Mod.	Alta
Inmunidad protectora*		Parcial	Parcial	Parcial	✓	✓	✓

Mod.: moderada. *resultados obtenidos hasta la fecha. Fuente: [31].

I. 5. APROXIMACIÓN DIVA

Una de las características recomendables para cualquier vacuna es que debe presentar propiedades DIVA. Como ya se ha explicado en la sección anterior, esta capacidad resulta esencial en la erradicación de enfermedades infecciosas como la PPA; además de garantizar un seguimiento adecuado de la vacunación y permitir la evaluación de su impacto en la evolución de la enfermedad. La aproximación DIVA se aplica a día de hoy a otras enfermedades porcinas, tales como la fiebre aftosa, la PPC y la enfermedad de Aujeszky, habiendo sido fundamental en la erradicación de esta última [115].

Para que la aproximación DIVA sea posible, es necesario el uso de un marcador constitutivo y otro negativo. En el caso de las LAVs, el marcador constitutivo está presente tanto en el virus vacunal como en el virus *wild type*, mientras que el negativo, supone la deleción de un gen en la vacuna que sea dispensable para la replicación viral. Además, puede resultar útil el uso de un

marcador positivo, mediante la inserción de un gen reportero en el genoma del virus vacunal. La amplificación de estos genes marcadores mediante PCR permite el diagnóstico DIVA a nivel molecular. Por otro lado, para que la vacuna presente propiedades DIVA serológicas, estos genes marcadores deben codificar proteínas que sean reconocidas por los anticuerpos generados en la respuesta inmune humoral del animal frente al vPPA (Figura I.5). De este modo, los animales infectados desarrollarán anticuerpos específicos frente al antígeno constitutivo y al marcador negativo, mientras que los animales vacunados presentarán anticuerpos frente al antígeno constitutivo y a la proteína reportera. Asimismo, este diagnóstico diferencial debe poder aplicarse tanto en explotaciones porcinas, como en animales salvajes para un adecuado seguimiento de la vacunación [116].

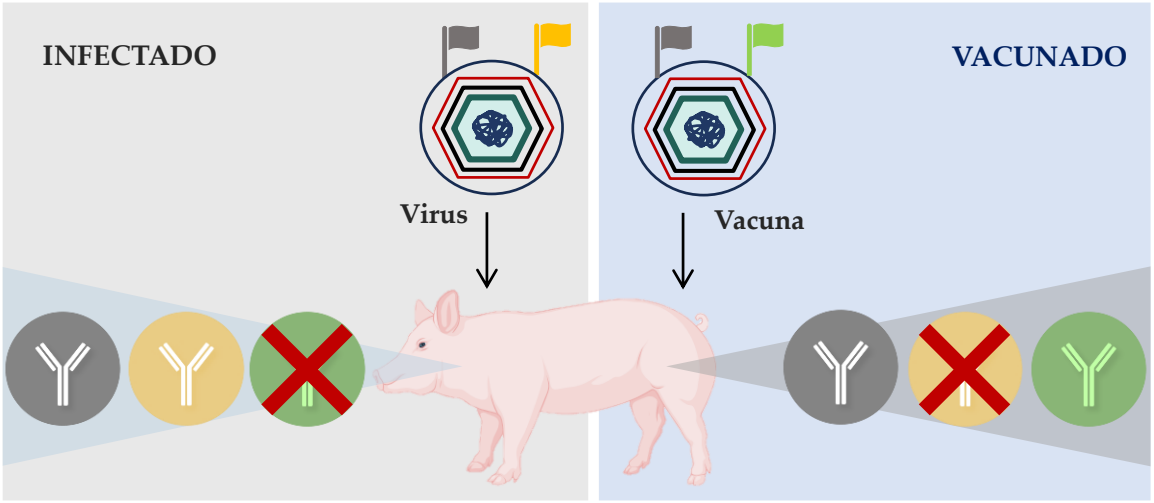


Figura I.5. Esquema de la aproximación DIVA. El antígeno constitutivo se representa en gris; en amarillo, el marcador negativo delecionado en la vacuna y, en verde, el marcador positivo insertado en la vacuna.

A día de hoy, se han identificado unos pocos antígenos que podrían potencialmente ser utilizados para desarrollar un diagnóstico DIVA. Sin embargo, no hay ningún estudio disponible sobre cinéticas de seroconversión frente a dichos antígenos y/o un análisis completo con un elevado número de muestras [117–120].

Con el objetivo de obtener una vacuna frente al vPPA con propiedades DIVA, surge el **proyecto europeo VACDIVA**, dentro del programa Horizonte 2020: *A safe DIVA vaccine for African Swine Fever control* (número de referencia: 862874), en el que se ha trabajado principalmente con el vPPA **Lv17/WB/Rie1** (GenBank: OR863252). Las inmunizaciones experimentales de cerdos domésticos y jabalíes con el aislado Lv17/WB/Rie1, indujeron una protección eficaz en los animales frente a desafíos

virulentos homólogos [106,121], posicionándolo así como una base prometedora para el desarrollo de vacunas. No obstante, algunos animales inoculados con este virus presentaron síntomas inespecíficos, lo que hizo necesario aumentar su atenuación para mejorar la seguridad del candidato vacunal. Con este objetivo, además de para aportar características DIVA a los prototipos vacunales, se han delecionado uno o varios genes virales específicos del virus parental, que se han sustituido por genes reporteros. Los genes con los que se ha trabajado en el presente estudio, así como sus productos génicos, se indican a continuación:

- **Genes delecionados**:

  - **Gen B119L:**

El gen viral B119L codifica la **proteína** no estructural **9GL**, también denominada p14 [122]. Esta proteína es una enzima de tipo sulfhidrilo oxidasa, dependiente de flavín adenín dinucleótido (FAD), que cataliza la formación de puentes disulfuro a partir de grupos tioles [123]. Su secuencia proteica está altamente conservada entre diferentes aislados del vPPA y la deleción de este gen reduce la replicación *in vitro* del virus [122]. Además, la proteína 9GL podría interaccionar con otras proteínas virales, participando en rutas metabólicas de tipo redox, que podrían jugar un papel importante en la síntesis y plegamiento de proteínas del virus [123]. El gen B119L se ha delecionado en algunos candidatos vacunales, resultando en una atenuación de las cepas parentales virulentas, pero sin llegar a obtener vacunas suficientemente inocuas o una protección que no causase síntomas en animales experimentales [122,124].

  - **Gen EP153R:**

El gen EP153R es homólogo al gen del hospedador que codifica una proteína lectina tipo C. El gen viral codifica la **pEP153R**, conocida también como proteína similar a lectina de tipo C [6], asociada a la especificidad serotípica [125]. La pEP153R también se ha relacionado con la inhibición de la apoptosis celular [126] y, como ya se ha indicado previamente, con la interferencia con el sistema inmune del hospedador, mediante su interacción con el MHC-I [22]. El estudio de su secuencia proteica ha permitido predecir que se trata de una proteína transmembrana de clase II, con múltiples sitios de glicosilación [34], pero su localización en el contexto de la infección no se ha identificado. Además, su modelo de estructura tridimensional se predijo en 2011 [22] y más recientemente, dicho modelo ha sido mejorado [127]. La pEP153R presenta un motivo RGD (Arg-Gly-Asp) de adhesión celular y es

homóloga a la proteína celular CD44, implicada en la activación de células T y adhesión de leucocitos. Por tanto, podría estar relacionada con la estabilización del fenómeno de la HAD del virus [34].

Asimismo, se han identificado en la proteína epítopos T que estimulan linfocitos TCD8+, lo que implica que podría participar en la activación de la respuesta celular inmune frente al vPPA [128]. Sin embargo, a pesar de que el gen EP153R se ha delecionado en múltiples candidatos vacunales [129–131], hasta ahora, no se había estudiado su potencial uso como antígeno en un ensayo DIVA.

- **Gen EP402R:**

El gen EP402R, también conocido como 8DR, codifica la **proteína CD2v** o hemaglutinina viral. La CD2v es una glicoproteína transmembrana de clase I, cuyo dominio extracelular es homólogo a la proteína CD2 (de sus siglas en inglés, *cluster of differentation 2*) del hospedador [32]. La proteína CD2v se localiza en la envuelta externa del virus [12] y tiene como primera función descrita la hemadsorción o hemaglutinación del vPPA [32]. Además, interfiere en el tráfico celular [132] y modula el sistema inmune, inhibiendo la migración de macrófagos o la expresión de citoquinas inflamatorias [113,133]. Al igual que la pEP153R, la proteína CD2v también participa en la especificidad serotípica [125] y se han identificado en su secuencia de aminoácidos epítopos de activación de linfocitos T [128].

La deleción de este gen ha mostrado la atenuación de algunas cepas virulentas [113,134,135], mientras que en otras, ha causado una enfermedad indistinguible de la causada por la cepa parental [114]. Por tanto, no se puede establecer una relación directa entre la deleción de este gen y la atenuación del vPPA, poniendo de manifiesto la complejidad de la identificación de los factores de virulencia del virus. Recientemente, se ha estudiado el potencial serológico DIVA de la proteína CD2v en el contexto de una vacuna frente al vPPA [119], así como su capacidad para distinguir cepas atenuadas circulantes en China con el gen EP402R delecionado [120].

- **Genes reporteros**:

- **Gen eGFP**:

El gen eGFP es un gen reportero ampliamente utilizado en diferentes estudios biológicos. El gen codifica una versión mejorada de la **proteína verde fluorescente,** denominada **eGFP** (de sus siglas en inglés, *enhanced green fluorescent protein*). En

publicaciones anteriores, se ha estudiado el posible papel inmunogénico de la eGFP en cerdos [136,137], sin haber conseguido detectar una respuesta de anticuerpos lo suficientemente robusta y elevada como para considerar la proteína una diana diagnóstica. Además, a pesar de que el gen eGFP ha sido insertado previamente en vacunas candidatas frente al vPPA [138,139], su inmunogenicidad en este contexto, así como el uso potencial de su producto génico como antígeno en un ensayo DIVA, no han sido estudiados hasta el momento.

- **Gen mCherry:**

De igual forma, el producto génico del gen mCherry, la **proteína mCherry**, es ampliamente utilizado como antígeno reportero en distintos experimentos *in vitro* e *in vivo*, sobre todo para el seguimiento de la expresión de proteínas [140]. Sin embargo, los estudios sobre su inmunogenicidad, y más aún en suidos, es limitado. Con frecuencia, la mCherry se utiliza como proteína de fusión en la inmunización de animales para obtener anticuerpos específicos frente a otro antígeno, o en estudios de inmunogenicidad celular, sobre todo, en la investigación del cáncer [141,142]. Por otro lado, a nivel de vacunas frente al vPPA, se ha usado como proteína reportera [112], pero su potencial como antígeno en un ensayo DIVA no ha sido estudiado previamente.

En el desarrollo de los ensayos DIVA se ha trabajado con tres **plataformas tecnológicas** diferentes: ELISA, ELISA-*microarray* y LFA, las cuales permiten detectar anticuerpos específicos en una muestra mediante el reconocimiento de una biomolécula capturadora. Este reconocimiento forma inmunocomplejos antígeno-anticuerpo, que luego se revelan gracias a una biomolécula marcada.

En cuanto al inmunoensayo **ELISA**, este se basa en la inmovilización en una placa de 96 pocillos de la biomolécula capturadora. Tras la adición de la muestra, el ensayo se revela utilizando una biomolécula marcada, generalmente, con la enzima peroxidasa (PO). De este modo, tras la adición de un cromógeno, se produce una reacción cuyo producto coloreado se cuantifica mediante la medida de su densidad óptica (DO) en un espectrofotómetro [143]. Esta técnica permitiría la detección de los anticuerpos presentes en la muestra frente a los antígenos de interés: constitutivo, negativo y positivo (Figura I.5), los cuales son necesarios para un diagnóstico de tipo DIVA, utilizando tres ELISA independientes.

Para evitar la realización de varios ensayos ELISA con el fin de obtener un diagnóstico diferencial, se ha empleado la plataforma **ELISA-*microarray***, una tecnología de detección múltiple [144]. Este tipo de tecnología permite el análisis de anticuerpos específicos frente a diferentes antígenos de forma simultánea en un único ensayo. Un *microarray* se compone de múltiples biomoléculas de captura inmovilizadas en un soporte sólido, cada una en una posición específica (Figura I.6). Cada biomolécula de captura se une a un analito diana de la muestra problema. Posteriormente, una biomolécula marcada permite detectar y cuantificar los analitos unidos. Así, la intensidad de la señal (cambio colorimétrico, fluorescencia, etc.), observada en una posición específica de la superficie del *microarray*, se correlaciona con la concentración de un único analito en la muestra.

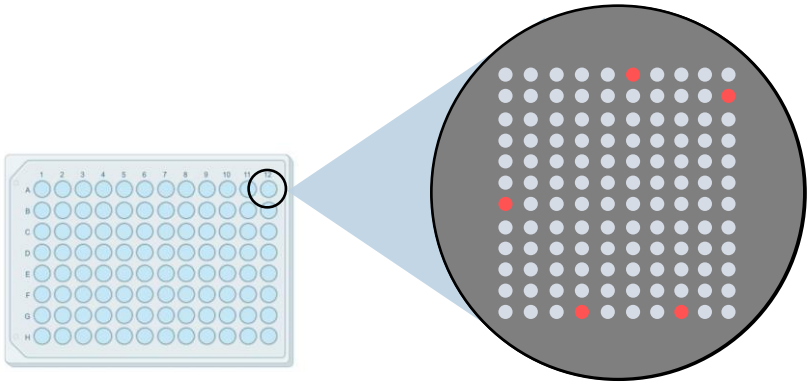


Figura I.6. Esquema de un ELISA-*microarray*. Cada pocillo contiene múltiples antígenos inmovilizados en posiciones concretas, dentro de una matriz 12x10. Los círculos rojos representan los puntos correspondientes al marcador posicional.

Finalmente, para trasladar el diagnóstico al campo, se ha empleado la tecnología **LFA** (Figura I.7), que permite obtener un resultado *in situ* [145]. Esta técnica se basa en la migración por capilaridad de la muestra problema y los reactivos reveladores del ensayo, a través de una membrana de nitrocelulosa. De este modo, si en la muestra hay anticuerpos específicos, estos reconocen al antígeno que recubre las partículas reveladoras. Cuando estos complejos partícula-antígeno-anticuerpo migran por la membrana, son retenidos por la biomolécula capturadora adsorbida en la línea test del ensayo, revelando así un resultado positivo que se visualiza a simple vista [145,146].

(a) (b)

Figura I.7. Esquema de una inmunocromatografía de flujo lateral (LFA). (a) Resultado negativo; **(b)** resultado positivo. Línea azul: línea control; línea roja: línea test.

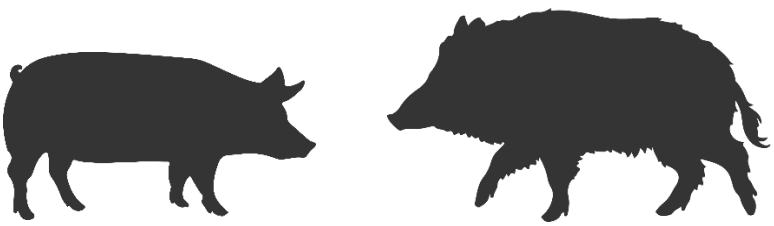
En la Tabla I.6 se resumen las características principales de las tres plataformas diagnósticas empleadas.

Tabla I.6. Características de las tres plataformas de diagnóstico que se utilizan en el presente trabajo de tesis doctoral.

Característica	Plataforma de diagnóstico		
	ELISA	ELISA-*microarray*	LFA
Método de cribado	Sí	Sí	No
Diagnóstico diferencial	No (es necesario hacer más de un ensayo)	Sí (hasta 20 antígenos/ enfermedades)	Sí (máximo 3 antígenos/ enfermedades diferentes)
Sensibilidad /especificidad	++ (más fácil de optimizar al ser un único antígeno)	++ (optimización más compleja)	+
Tiempo del ensayo	1–3 h	1–3 h	10–20 min
Dificultad	++	++	+
Requiere personal especializado	Sí	Sí	No
Equipamiento especial	Sí, pero es común en cualquier laboratorio de diagnóstico	Sí	No
Estable a temperatura ambiente	No	No	Sí
Es posible su aplicación *in situ*	No	No	Sí

Comparativa cualitativa: de menos (+) a más (+++).

CAPÍTULO II OBJETIVOS



El **objetivo principal** del presente trabajo de tesis es el desarrollo y diseño de un ensayo de diagnóstico de tipo DIVA frente al vPPA, para cerdo doméstico y jabalí.

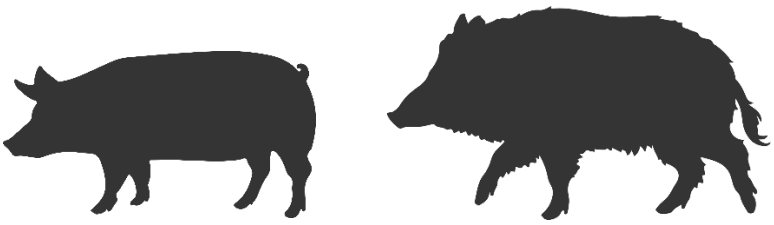
Para su consecución, los **objetivos específicos** que se plantean son:

- **Objetivo 1**: obtención y caracterización de reactivos para el desarrollo de los inmunoensayos diagnósticos.

- **Objetivo 2**: diseño, desarrollo y optimización de un ensayo serológico de tipo DIVA, utilizando diferentes plataformas tecnológicas: ELISA, ELISA-*microarray* y LFA.

- **Objetivo 3:** validación en campo de los ensayos desarrollados.

CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS



III. 1. MATERIALES

III. 1. 1 Células

III. 1. 1. 1 Cepas bacterianas

Para la replicación y selección de los plásmidos se emplearon dos cepas de células competentes de *Escherichia coli*:

- One Shot™ Mach1™ T1® (Invitrogen): genotipo F$^-$ Φ80*lac*ZΔM15 Δ*lac*X74 *hsd*R(r_K^-, m_K^+) Δ*rec*A1398 *end*A1 *ton*A.
- NZY5α (Nzytech): genotipo *fhu*A2Δ(argF-lacZ)U169 *pho*A *gln*V44 Φ80*lac*ZΔ M15 *gyr*A96 *rec*A1 *rel*A1 *end*A1 *thi*-1 *hsd*R17.

La expresión de proteínas recombinantes se llevó a cabo en la siguiente cepa de *E. coli*:

- BL21 One Shot™ (Invitrogen): genotipo F- *omp*T *hsd*S_B ($r_B^-m_B^-$) *gal dcm* (DE3).

III. 1. 1. 2 Líneas celulares de insecto

- Sf9 (clon 9, CRL-1711™, ATCC®): derivada de tejido ovárico pupal de gusano (*Spodoptera frugiperda*). Esta línea celular se empleó en el aislamiento y propagación de los baculovirus recombinantes, así como en la expresión intracelular de proteínas recombinantes.
- Sf900: variante de la línea celular Sf9, adaptada a crecer en ausencia de suero. Se utilizó para la obtención de proteínas recombinantes extracelulares.

III. 1. 1. 3 Líneas celulares de mamífero

- HEK-293-F (Invitrogen): variante de crecimiento rápido de células humanas embrionarias de riñón (HEK), adaptada a crecer en medio libre de suero. Esta línea celular se utilizó para la expresión de proteínas recombinantes en el sistema de mamífero.
- Sp2/0-Ag14 (CRL-1581™, ATCC®): línea celular no secretora de inmunoglobulinas (Ig), derivada de células de hibridoma obtenidas mediante la fusión de un linfocito B y una célula de mieloma del organismo *Mus musculus*. Estas células se utilizaron para la obtención de células de hibridomas secretoras de IgG.

III. 1. 2 Medios de cultivo

En la Tabla III.1 se indican los medios de cultivos utilizados para las cepas bacterianas y las líneas celulares utilizadas.

Tabla III.1. Medios de cultivo utilizados.

Bacterias/ líneas celulares	Medio de cultivo	Casa comercial	Suplementos, aditivos
Bacterias	Luria-Broth (LB)	DIFCO™	Antibióticos: - Ampicilina (Amp): 100 µg/ml - Espectinomicina (Spc): 50 µg/ml Para medio sólido: - Bacto™ Agar (ThermoFisher): 15 g/l
	Superóptimo con represión por catabolito (S.O.C.)	Invitrogen	NA
Sf9	Grace	Gibco®	- Suero fetal bovino inactivado (56 °C, 30 min): 8 % (v/v) - Plurónico: 0,1 % (m/v) - Gentamicina: 50 µg/ml
Sf900	Sf-900™ II SFM 1X	Gibco®	- Plurónico: 0,1 % (m/v) - Gentamicina: 50 µg/ml
HEK-293-F	Freestyle™ 293	ThermoFisher	NA
Sp2/0-Ag14/ hibridomas	DMEM	Gibco®	- Suero fetal bovino inactivado (56 °C, 30 min): 10 % (v/v)
	Hybridoma-SFM	Gibco®	*Base:* - Suero fetal bovino inactivado (56 °C, 30 min): 10 % (v/v) (Gibco®) - Antibióticos y antimicóticos 1X (Sigma) *Otros suplementos:* - HAT 1X (50X: 5 mM hipoxantina, 20 µM aminopterina y 0,8 mM timidina, Gibco®) - HT 1X (50X: 5 mM hipoxantina y 0,8 mM timidina, Gibco®) - HyCryo-STEM (Cytiva) - Suplemento de clonación y fusión de hibridomas (Roche)

NA: no aplica.

III. 1. 3 Virus

Para la producción de baculovirus recombinantes, se utilizó el ADN genómico BacPAK6 procedente del nucleopoliedrovirus múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV), que tiene el gen nativo de la poliedrina sustituido por el gen *lacZ*, que codifica la proteína β-galactosidasa. En los baculovirus recombinantes producidos (Tabla III.2), el gen *lacZ* se reemplazó por el gen codificante del antígeno de interés.

Así, la selección de los virus recombinantes se realizó en función de la actividad de la enzima β-galactosidasa, que degrada el sustrato X-Gal, dando lugar a un producto de color azul.

Tabla III.2. Baculovirus recombinantes producidos.

Nombre	Gen de interés
AcHLTA/B119L	B119L
AcHLTA/GW/EP402R	EP402R
AcGP67/GW/EP402R	EP402R
AcHLTA/eGFP	eGFP
AcHLTA/mCherry	mCherry

III. 1. 4 Genes sintéticos

Los genes sintéticos se diseñaron a partir de la secuencia obtenida en la base de datos GenBank® [acceso en línea: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/] o UniProt [acceso en línea: https://www.uniprot.org/] (Tabla III.3). Las secuencias de nucleótidos codificantes se optimizaron para los distintos sistemas de expresión utilizando dos herramientas: Codon Optimization Tool (Integrated DNA Technologies, IDT) [acceso en línea: https://www.idtdna.com/pages/tools/codon-optimization-tool], o Cloned Genes - Instant Designer (TermoFisher Scientific) [acceso en línea: https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/cloning/gene-synthesis.html].

Los genes sintéticos fueron sintetizados por IDT o Eurofins Genomics. A su llegada, el liofilizado se resuspendió en H_2O libre de nucleasas, siguiendo las indicaciones de cada fabricante.

Tabla III.3. Genes sintéticos.

Nombre del gen sintético	Origen	Genotipo	No. de acceso (GenBank®/ UniProt)	Nt	Optimización
B119L	vPPA Lv17/WB/Rie1	II	WPS70875.1	1–360	*E. coli*
EP153R.I	vPPA BA71V	I	NP_042751.1	76–459	*H. sapiens*
EP153R.II.1	vPPA Lv17/WB/Rie1	II	WPS70858 .1	79–477	*H. sapiens*
EP153R.II.2	vPPA Lv17/WB/Rie1	II	WPS70858.1	79–477	*H. sapiens*
EP402R.1	vPPA Georgia07	II	WPS70859.1	1–612	*S. frugiperda*
EP402R.2	vPPA Georgia07	II	WPS70859.1	1–612	*H. sapiens*
eGFP	*Aequorea victoria*	NA	C5MKY7*	1–720	*E. coli*
mCherry	*Anaplasma marginale*	NA	X5DSL3*	1–711	*E. coli*

Nt: nucleótidos. NA: no aplica. *: UniProt.

III. 1. 5 Oligonucleótidos

Para la amplificación de los genes sintéticos o un fragmento de los mismos, así como en pasos posteriores de comprobación del gen clonado, se utilizaron oligonucleótidos específicos. Algunos oligonucleótidos se diseñaron para incluir dianas de enzimas de restricción a los extremos 5′ o 3′ del gen, así como otro tipo de secuencias de interés. La secuencia, orientación y modificaciones que añade cada oligonucleótido a su gen diana, se detallan en la Tabla III.4.

Tabla III.4. Oligonucleótidos específicos utilizados en la clonación de los genes.

Cebador	Secuencia (5′-3′)[2]	Secuencias que añaden/modifican
1_D	atgcttcactggggtcctaag	-
2_R	ttaaagggaagaccaggctcc	-
3_D	TTGGCGCGCCaataaataaacccatatgt	AscI
4_R	CCGCTCGAGACCTTGGAAATAGAGATTTTCcttgctgc atatgtagagcaa	XhoI, secuencia proteasa TEV
5_R	AATCTCGAG**TCA***GTGATGGTGATGGTGATG*TGATC CTCCGCCTCCGCTTCCTCCGCCTCCgttcacccaatagttag a	XhoI, codón de parada, 6xHis, 2x[4xGlySer]
6_D	TTGGCGCGCCcattaacaagcccatc	AscI
7_R	CCGCTCGAGcttgctgcagatgtacag	XhoI
8_D	TTGGCGCGCCCtgggacaactac	AscI
9_R	CCGCTCGAGcttgccgcagatgaa	XhoI
10_D	**TTA**cttgaaaaaagtatagaaatagtt	Codón de parada
11_R	atgataattctcatatttctgatattc	-
12_D	**ATG***CATCACCATCACCATCAC*ataattctcatatttctgatattc	Codón de inicio, 6xHis
13_D	TTGGCGCGCCaattatcttgatcttttg	AscI
14_R	CCGCTCGAGACCTTGGAAATAGAGATTTTCcttgaag aacgtgtagaaata	XhoI, secuencia proteasa TEV
15_D	TTGGCGCGCCTcataacgacgtgtttgatact	AscI
16_R	AATCTCGAG**TCA***GTGATGGTGATGGTGATG*TGATC CTCCGCCTCCGCTTCCTCCGCCTCCcttgaagaacgtgta	XhoI, codón de parada, 6xHis, 2x[4xGlySer]
17_D	atggtgagcaaaggtgaagaactg	-
18_R	ttatttgtacagttcatccatacctaag	-
19_D	atggtgagcaaaggtgaagagg	-
20_R	ttacttatacagttcatccataccac	-

[1]D: orientación directa; R: orientación reversa. [2]Leyenda de las secuencias incorporadas a los genes sintéticos en la amplificación: sitios de restricción (subrayado), diana de la proteasa del TEV (verde); etiqueta 6xHis (cursiva), codón de inicio o de parada (negrita), péptido espaciador 2x[4xGlySer] (color rojo).

Además, se utilizaron oligonucleótidos generales en la comprobación de la orientación y/o presencia de insertos durante el proceso de clonación, así como en la secuenciación de los plásmidos recombinantes. En la Tabla III.5 se detalla la secuencia específica, la orientación y el vector donde hibrida cada uno de ellos.

Tabla III.5. Oligonucleótidos generales.

Nombre	Orientación	Secuencia (5′–3′)	Vector(es) donde hibridan
T7 F	Directo	TAATACGACTCACTATAGGG	pCR™8/GW/TOPO™
T7 R	Reverso	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	
M13 F	Directo	GTAAAACGACGGCCAG	Vectores destino del sistema Gateway
M13 R	Reverso	CAGGAAACAGCTATGAC	
VP1.5	Directo	GGACTTTCCAAAATGTCG	pCMV6-AC-FC-S
XL39	Reverso	ATTAGGACAAGGCTGGTGGG	

Ambos tipos de oligonucleótidos fueron sintetizados por Eurofins Genomics. Los oligonucleótidos se resuspendieron en 100 µl de H_2O libre de nucleasas, siguiendo las indicaciones del fabricante.

III. 1. 6 Vectores

Se utilizaron distintos vectores para la clonación y expresión de los genes sintéticos. En la Tabla III.6 se recogen las principales características de los vectores empleados. Los plásmidos recombinantes generados se indican en la Tabla III.7.

Tabla III.6. Vectores utilizados.

Vector	Promotor	Tipo de vector	Resistencia	Etiqueta	Expresión
pCR™8/GW/ TOPO™	NA	Donante (Gateway®)	Spc	NA	NA
pDEST™15	T7	Expresión en *E. coli*	Amp	GST*	Intracelular
pDEST™17	T7	Expresión en *E. coli*	Amp	6xHis*	Intracelular
pAcHLTA/GW[1]	Poliedrina	Expresión en insecto	Amp	6xHis*	Intracelular
pAcGP67/GW[1]	Poliedrina	Expresión en insecto	Amp	Ninguna	Extracelular
pCMV6-AC-FC-S	CMV	Expresión en mamífero	Amp	IL-2*, Fc de IgG de ratón**	Extracelular
pCMV6-AC-His	CMV	Expresión en mamífero	Amp	6xHis**	Intracelular

[1]Vectores modificados en GSD Madrid para su aplicación en el sistema Gateway®. Spc: espectinomicina; Amp: ampicilina. *: se agrega en el extremo amino-terminal; **: se agrega en el extremo carboxi-terminal. GST: Glutatión S-transferasa; 6xHis: 6 histidinas; IL-2: péptido señal de la interleucina-2. NA: no aplica.

Tabla III.7. Plásmidos recombinantes generados.

Gen de interés	Gen sintético clonado (nucleótidos)	Plásmido recombinante generado	Proteína expresada (N terminal-C terminal)	
			Forma	Masa molecular teórica (kDa)*
B119L	B119L (1–360)	pCR™8/GW/TOPO™/B119L	NA	NA
	B119L (1–360)	pDEST™15/B119L	GST-9GL	42,5
	B119L (1–360)	pDEST™17/B119L	His-9GL (E. coli)	17,5
	B119L (1–360)	pAcHLTA/GW/B119L	His-9GL (Sf9)	20,0
EP153R genotipo I	EP153R.I (151–459)	pCMV6-AC-FC-S/EP153R.I	pEP153R I-Fc	41,4
EP153R genotipo II	EP153R.II.1 (142–474)	pCMV6-AC-FC-S/EP153R.II/1	pEP153R II-TEV-Fc	43,2
	EP153R.II.1 (151–381)	pCMV6-AC-FC-S/EP153R.II/2	pEP153R II-His	13,7
	EP153R.II.2 (142–474)	pCMV6-AC-FC-S/EP153R.II/3	pEP153R II-Fc	42,4
EP402R	EP402R.1 (1–612)	pCR™8/GW/TOPO™/EP402R	NA	NA
	EP402R.1 (1–612)	pAcHLTA/GW/EP402R	His-CD2v (Sf9)	29,7
	EP402R.1 (1–612)	pAcGP67/GW/EP402R	His-CD2v (Sf900)	30,1
	EP402R.2 (1–612)	pCMV6-AC-FC-S/EP402R/1	CD2v-Fc	53,3
	EP402R.2 (261–612)	pCMV6-AC-FC-S/EP402R/2	CD2v-His	17,9
eGFP	eGFP (1–720)	pCR™8/GW/TOPO™/eGFP	NA	NA
	eGFP (1–720)	pDEST™15/eGFP	GST-eGFP	55,1
	eGFP (1–720)	pDEST™17/eGFP	His-eGFP (E. coli)	30,0
	eGFP (1–720)	pAcHLTA/GW/eGFP	His-eGFP (Sf9)	32,6
mCherry	mCherry (1–711)	pCR™8/GW/TOPO™/mCherry	NA	NA
	mCherry (1–711)	pDEST™17/mCherry	His-mCherry (E. coli)	29,8
	mCherry (1–711)	pAcHLTA/GW/mCherry	His-mCherry (Sf9)	32,4

Etiquetas: GST (Glutatión S-transferasa); His (6 histidinas); Fc (región Fc de la IgG de ratón). *sin tener en cuenta modificaciones postraduccionales. NA: no aplica.

III. 1. 7 Anticuerpos monoclonales

Se utilizaron anticuerpos monoclonales (AcM) disponibles en el catálogo de GSD Madrid, así como otros AcM comerciales que se indican en la Tabla III.8. Los AcM de GSD Madrid se utilizaron sin marcar o conjugados a PO.

Tabla III.8. Anticuerpos monoclonales comerciales utilizados en el presente trabajo.

Nombre	Casa comercial	Isotipo	Especificidad
1BH7	GSD Madrid	IgG1	Fc de IgG de cerdo
G1	GSD Madrid	IgG1	Fc de IgG de cerdo
3H11	GSD Madrid	IgG1	GST
18BG3	GSD Madrid	IgG2a	Proteína del vPPA: p72
17LD3	GSD Madrid	IgG1	Proteína del vPPA: p72
anti-His	Invitrogen	IgG	Etiqueta 6xHis
anti-His-PO	Invitrogen	IgG	Etiqueta 6xHis
anti-Fc de ratón-PO	Invitrogen	IgG	Fc de IgG ratón
anti-Fc de ratón-FA	Invitrogen	IgG	Fc de IgG ratón
anti-IgG1	Sigma	IgG	IgG1 de ratón
anti-IgG2a	Sigma	IgG	IgG2a de ratón
anti-IgG2b	Sigma	IgG	IgG2b de ratón
anti-IgG3	Sigma	IgG	IgG3 de ratón
anti-IgA	Sigma	IgG	IgA de ratón
anti-IgM	Sigma	IgG	IgM de ratón

PO: peroxidasa; FA: fosfatasa alcalina.

Además, los AcM producidos en el presente trabajo se recogen en la Tabla III.9.

Tabla III.9. Anticuerpos monoclonales generados en el presente trabajo.

Nombre	Isotipo	Especificidad
8D2E3	IgG1	eGFP
5A6D2	IgG1	eGFP
3F7D4	IgG1	eGFP
8G7A7	IgG1	eGFP
4A2E5	IgG1	eGFP

III. 1. 8 Muestras biológicas

A continuación, se describen las muestras procedentes de animales experimentales o de campo, que se utilizaron en el presente trabajo.

III. 1. 8. 1 Muestras experimentales

Las muestras experimentales utilizadas en los ensayos se obtuvieron dentro del Proyecto Europeo VACDIVA. Las vacunas candidatas utilizadas en los experimentos *in vivo*, cuyas muestras se han analizado en el presente trabajo, se indican en la Tabla III.10.

En este trabajo se utilizaron como técnicas de referencia para la caracterización de las muestras los ELISA comerciales INgezim® PPA Compac (GSD Madrid SA) e INgezim® ASFV-R, así como en el ensayo IPT [80].

Tabla III.10. Vacunas candidatas.

Vacuna candidata*	Genes delecionados (marcadores negativos)	Genes reporteros (marcadores positivos)
Lv17/WB/Rie1-Δ153	EP153R	eGFP
Lv17/WB/Rie1-Δ153-Δ402	EP153R, EP402R	eGFP
Lv17/WB/Rie1-Δ153-Δ402-ΔUK	EP153R, EP402R, UK*	eGFP, mCherry
Lv17/WB/Rie1-ΔMGF	MGF110-11L	eGFP
Lv17/WB/Rie1-ΔUK	UK o DP96R	mCherry

*A lo largo del trabajo se ha utilizado la nomenclatura abreviada de los genes delecionados con la finalidad de facilitar la lectura.

III. 1. 8. 1. 1 Sueros experimentales

Los sueros experimentales se recogieron en experimentos *in vivo* llevados a cabo bajo la Directiva Europea 86/609/EEC, y el Comité Ético de Bienestar Animal (PROEX 125/16, 101.8/21, 338/15, 15, 159/19, 113.3/21, 090.4/21, 101.8/21 y 424/2020-PR). Los experimentos con cerdos domésticos se realizaron principalmente en las instalaciones BSL-3 del CSIC-CISA-INIA (Valdeolmos, Madrid, España), y con jabalíes, en VISAVET, UCM (Madrid, España).

Las muestras de suero se clasificaron en distintos grupos (Tabla III.11), según las características de los virus utilizados en la vacunación y/o infección. De este modo, el grupo A estuvo formado por muestras procedentes de cerdos domésticos infectados con el virus parental Lv17/WB/Rie1 o vacunados con los distintos candidatos vacunales derivados de este. El grupo B presentó las mismas características, pero con muestras recogidas de jabalíes. Los grupos C, D y E, correspondieron a muestras procedentes de cerdos domésticos infectados con aislados del vPPA, diferentes al virus parental, de genotipo II, I y XXIII, respectivamente. Finalmente, el grupo F estuvo formado por muestras de animales

infectados con virus diferentes al vPPA. Por otro lado, se utilizó en algunos casos un suero de referencia positivo a anticuerpos anti-vPPA, facilitado por el EURL.

El desafío de los animales se realizó por vía intramuscular con una dosis de 10 HAU_{50} de la cepa virulenta Arm07, de genotipo II; exceptuando aquellos casos en los que se indica a continuación.

- **Grupo A1.** Cerdos domésticos infectados con Lv17/WB/Rie1:

Formado por 42 sueros procedentes de 5 cerdos inoculados experimentalmente por vía intramuscular, con 10^2 $TCID_{50}$ del vPPA Lv17/WB/Rie1 [datos del EURL no publicados]. Los 5 animales se desafiaron a los 30 días posinfección (dpi). Además, se incluyeron 72 muestras de otros dos cerdos; uno de ellos inoculado con 10 $TCDI_{50}$ de Lv17/WB/Rie1 (PW13) y otro puesto en contacto con el animal PW13 (PW14). A los 58 dpi, estos dos animales se pusieron en contacto con un animal inoculado con el virus virulento Lv17/WB/Zieme3 [106]. Por último, se analizaron las muestras de suero correspondientes a 5 animales (IM1-IM5), inoculados vía intramuscular con 10 $TCID_{50}$ Lv17/WB/Rie1, recogidas en el momento del sacrificio [datos del EURL no publicados].

- **Grupo A2.** Cerdos domésticos vacunados con 3 vacunas candidatas, todas ellas con el gen EP153R delecionado y el gen eGFP insertado:

Grupo constituido por 198 sueros procedentes de 16 cerdos vacunados experimentalmente vía intramuscular, con 10^2 $TCID_{50}$ de diferentes vacunas prototipos con el gen EP153R como marcador negativo y el gen eGFP como marcador positivo: Lv17/WB/Rie1-Δ153 [datos del EURL no publicados], Lv17/WB/Rie1-Δ153-Δ402 [147], Lv17/WB/Rie1-Δ153-Δ402-ΔUK [datos del EURL no publicados]. Todos los animales se desafiaron a los 30 o 35 días posvacunación (dpv).

- **Grupo A3.** Cerdos domésticos vacunados con vacunas prototipo, que contienen como marcador negativo otro gen diferente al EP153R y como marcador positivo el gen eGFP:

Grupo constituido por 25 sueros procedentes de 5 cerdos vacunados experimentalmente vía intramuscular, con 10^2 $TCID_{50}$ de la vacuna marcada prototipo: Lv17/WB/Rie1-ΔMGF. Todos los animales se desafiaron a los 21 dpi [148]. Los experimentos de este grupo se realizaron en las instalaciones BSL-3 del Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche "Togo Rosati" (Perugia, Italia).

- **Grupo A4.** Cerdos domésticos vacunados con otras vacunas candidatas que contienen el gen dsRed como marcador positivo:

Formado por 3 sueros procedentes de 1 cerdo vacunado experimentalmente vía intramuscular, con 10^2 $TCID_{50}$ de la vacuna prototipo Lv17/WB/Rie1-ΔUK [datos del EURL no publicados].

- **Grupo B1.** Jabalíes inmunizados con Lv17/WB/Rie1:

Grupo formado por 87 sueros procedentes de 8 animales diferentes, inmunizados vía oral con 10^3 o 10^4 $TCID_{50}$ del virus Lv17/WB/Rie1 y un refuerzo a los 18 días con la misma dosis. Todos los animales se desafiaron a los 42 dpi tras la primera inmunización [121].

- **Grupo B2.** Jabalíes vacunados con la vacuna prototipo Lv17/WB/Rie1-Δ153-Δ402:

Grupo constituido por 96 sueros procedentes de 8 animales vacunados experimentalmente vía oral. Cuatro de los 8 animales se vacunaron con 10^2 $TCID_{50}$ de Lv17/WB/Rie1-Δ153-Δ402. A los 30 días, a los animales se les dio un refuerzo con 10^4 $TCID_{50}$ de la misma vacuna candidata y se desafiaron 14 días después de la segunda dosis. Por otro lado, los otros 4 animales se vacunaron con una única dosis de 10^4 $TCID_{50}$ de la vacuna Lv17/WB/Rie1-Δ153-Δ402 y se desafiaron a los 30 dpv [147].

- **Grupo C.** Cerdos domésticos infectados con otros aislados del vPPA de genotipo II, distintos al virus parental:

Formado por 121 sueros de 9 cerdos domésticos inmunizados experimentalmente. Dos de los 9 animales se inocularon vía intramuscular con 10 $TCID_{50}$ del aislado Pol18/WB/Case1794, y otros 4 animales fueron puestos en contacto [datos del EURL no publicados]. Los otros 3 animales restantes se inmunizaron intramuscularmente con la misma dosis, dos de ellos con el aislado Lv17/WB/Rie14/Tukuma5 [datos del EURL no publicados] y el último animal, con el vPPA Es16/WB-Viru8 [65].

- **Grupo D.** Cerdos domésticos infectados con aislados del vPPA de genotipo I:

Este grupo estuvo constituido por 45 sueros de 9 cerdos domésticos inoculados experimentalmente. Dos de 9 se infectaron vía intramuscular con una dosis de 10^2 $TCID_{50}$ del aislado NH/P68 y se desafiaron a los 29 dpi [129]. Otros tres animales se inocularon intramuscularmente con 10^5 $TCID_{50}$ del aislado NH/P68 y se

desafiaron con Lisbon60 a los 29 dpi [129]. El sexto animal se inoculó vía oronasal con 10^2 $TCID_{50}$ del aislado E75 y posteriormente fue desafiado con la cepa virulenta E70 [datos del EURL no publicados]. El séptimo animal fue inmunizado con 10 HAU_{50} del aislado OURT 88/3 [datos del EURL no publicados]. Por último, los dos animales restantes se inocularon vía intramuscular con 10^3 del aislado modificado Benin 97/1-Δ148R y, a los 21 dpi, se aplicó un refuerzo a la misma dosis; los animales se desafiaron intramuscularmente a los 39 dpi con 10^4 $TCDI_{50}$ de la cepa virulenta Benin 97/1 [149].

- **Grupo E.** Cerdos domésticos infectados con aislados del vPPA de genotipo XXIII:

Constituido por 21 sueros procedentes de 2 cerdos domésticos infectados tras ponerse en contacto con otros animales inoculados experimentalmente con 10 HAU_{50} del aislado ET13/1504 [datos del EURL no publicados].

Tabla III.11. Sueros experimentales utilizados en el estudio de infecciones con vPPA o candidatos vacunales.

Grupo	Animal	Aislado del vPPA/ vacuna candidata	Genotipo	Nº de muestras	Nº de animales	dpi/ dpv
A1	Cerdo	Lv17/WB/Rie1	II	45	5	0–54
				36	1	0–126
				36	1	0–126
				5	5	17–65
A2	Cerdo	Lv17/WB/Rie1-Δ153	II	78	6	0–54
		Lv17/WB/Rie1-Δ153-Δ402	II	60	5	0–54*
		Lv17/WB/Rie1-Δ153-Δ402-ΔUK	II	60	5	0–54
A3	Cerdo	Lv17/WB/Rie1-ΔMGF	II	25	5	0–35
A4	Cerdo	Lv17/WB/Rie1-ΔUK	II	3	1	0–14
B1	Jabalí	Lv17/WB/Rie1	II	51	5	0–67
				36	3	0–67
B2	Jabalí	Lv17/WB/Rie1-Δ153-Δ402	II	52	4	0–62
				44	4	0–61
C	Cerdo	Pol18/WB/Case1794	II	44	2	0–66
		Lv17/WB/Rie14/Tukuma5	II	62	2	0–121
		Es16/WB-Viru8	II	15	1	0–72
D	Cerdo	NH/P68	I	21	2	0–72
				6	3	0–51
		E75	I	7	1	0–51
		OURT 88/3	I	5	1	22–108
		Benin 97/1-Δ148R	I	6	2	0–43
E	Cerdo	ET13/1504	XXIII	21	2	0–52

dpi: días posinfección, dpv: días posvacunación. *: las muestras recogidas a más de 60 dpv (sacrificio) también se analizaron como muestras pareadas en la evaluación de los tejidos.

- **Grupo F.** Cerdos domésticos infectados con otros virus:

Grupo formado por 23 muestras de suero procedentes de cerdos domésticos infectados experimentalmente con Pestivirus. Los experimentos se llevaron a cabo en las instalaciones del Friedrich-Loeffler-Institut (Greifswald, Alemania). Concretamente, 16 de las muestras eran positivas a anticuerpos frente al vPPC, 4 al virus de la enfermedad de la frontera (BDV) y 2 al virus de la diarrea viral bovina (BVDV). Todas las muestras habían sido caracterizadas mediante la técnica de neutralización [150].

III. 1. 8. 1. 2 Otras muestras experimentales

Como muestras alternativas a los sueros, se incluyeron muestras de sangres y tejidos:

- **Sangres**:

Las sangres de los animales del Grupo A3 y Grupo C (Lv17/WB/Rie14/Tukuma5) (Tabla III.11) se recogieron con anticoagulante (EDTA).

- **Tejidos**:

Se analizaron extractos de tejidos procedentes de cerdos domésticos infectados experimentalmente con los aislados Lv17/WB/Rie1 o Pol18/WB/Case1794, o vacunados con el mutante Lv17/WB/Rie1-Δ153-Δ402 (Tabla III.12). Los tejidos se obtuvieron tras el sacrificio de los animales utilizados en los experimentos *in vivo*, descritos en el apartado anterior. En el caso de los tejidos con líquido intersticial (pulmón, corazón, bazo, riñón, hígado y diafragma) se analizó este exudado, mientras que, para el análisis de médulas óseas, fue necesario procesar la muestra para obtener un homogeneizado del tejido [67].

Tabla III.12. Tejidos procedentes de animales experimentales.

Grupo	Aislado del vPPA/ vacuna candidata	Órgano		Día de recogida (dpi/dpv)
		Tipo	No.	
A1	Lv17/WB/Rie1 (animales IM1-IM5)	Pulmón	5	17, 25, 64, 65
		Corazón	5	17, 25, 64, 65
		Riñón	2	65
		Hígado	3	17, 25, 64
		Diafragma	5	17, 25, 64, 65
		Médula ósea	5	17, 25, 64, 65
A2	Lv17/WB/Rie1-Δ153-Δ402	Pulmón	5	62, 64, 68
		Bazo	5	62, 64, 68
		Riñón	1	68
		Hígado	4	62, 64
		Diafragma	5	62, 64, 68
		Médula ósea	5	62, 64, 68
C	Pol18/WB/Case1794	Pulmón	6	24, 36, 64, 66
		Bazo	6	24, 36, 64, 66
		Corazón	6	24, 36, 64, 66
		Diafragma	6	24, 36, 64, 66
		Médula ósea	6	24, 36, 64, 66

dpi: días posinfección, dpv: días posvacunación.

III. 1. 8. 2 Muestras de campo

Se analizaron muestras de campo de zonas libres de PPA, así como de regiones donde se han notificados brotes de la enfermedad.

III. 1. 8. 2. 1 Muestras negativas de campo de zonas libres de PPA

Las muestras negativas de campo procedían de animales de zonas libres de PPA. Se incluyeron 384 sueros de campo, 150 procedentes de cerdos domésticos y 234 de jabalíes salvajes; así como 250 muestras de sangres de cerdos domésticos. En cuanto a las muestras de tejido, se analizó un total de 11 muestras procedentes de 5 jabalíes y 6, de cerdos domésticos (pulmón: 2, corazón: 2, bazo: 3, riñón: 2, e hígado: 2).

III. 1. 8. 2. 2 Muestras de campo de zonas donde ha circulado el vPPA

Se analizó un total de 2353 muestras procedentes de la vigilancia en campo llevada a cabo por distintos laboratorios nacionales de referencia de la PPA de 6 países europeos:

- Estonia: National Centre for Laboratory Research and Risk Assessment).
- Italia (Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna.

- Letonia: Institute of Food safety, Animal Health and Environment.
- Lituania: National Food and Veterinary Risk Assessment Institute.
- República Checa: Státní veterinární ústav Jihlava.
- Serbia: Institute of Veterinary Medicine of Serbia.

La naturaleza de las muestras analizadas se indica en la Tabla III.13.

Tabla III.13. Muestras de campo utilizadas en la validación de los ensayos.

Tipo de muestra	No. de muestras	
	Cerdos	Jabalíes
Suero	231	560
Sangre	72	777
Exudado de bazo	318	14
Homogeneizado de tejidos	59	162
Médula ósea	0	160
Total	**680**	**1673**

III. 1. 9 Soluciones y tampones

En la Tabla III.14 se indican las soluciones y los tampones comerciales y no comerciales empleados en el presente trabajo.

Tabla III.14. Tampones y soluciones empleados.

Nombre del tampón/solución	Composición/nombre comercial
Diluyente de muestra de ELISA: DE01, DE13, DE31, DE34	Composición confidencial (GSD Madrid). El número del diluyente indica, de menos a más, la capacidad de bloqueo del diluyente
Diluyente de muestra de LFA: TDM-1, TDM-2, TDM-3, TDM-4	Composición confidencial (GSD Madrid). El número del diluyente indica, de menos a más, la capacidad de bloqueo del diluyente
PBS (tampón fosfato salino)	NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, KH2PO4 1,5 mM, Na2HPO4 8,1 mM, pH 7,4
PBST	Tween 20 0,05 % (v/v), PBS
Solución de bloqueo *western blot*	PBST, leche 5 % (m/v)
Solución de bloqueo y estabilizante de ELISA	StabilZyme™ SELECT Stabilizer (Surmodics)
Solución de borohidruro	10 mg NaBH4/ml en 0,1 mM NaOH
Solución de desteñido	Metanol 20 % (v/v), ácido acético 8 % (v/v)
Solución de lavado de ELISA	PBST, NaCl 135 mM, Kathon 0,005 % (v/v)
Solución de lavado posimpresión	Composición confidencial (GSD Madrid)

Continuación Tabla III.14.

Nombre del tampón/solución	Composición/nombre comercial
Solución de teñido	PhastaGelTM Blue R 2,5 g/l, metanol 45 % (v/v), ácido acético 10 % (v/v)
Solución estabilizante de conjugado	StabilZyme™ HRP Conjugate Stabilizer (Surmodics), pudiendo ser suplementada con NaCl 0,5 M
Tampón bicarbonato	NaHCO3 25 mM
Tampón carbonato	Na2CO3 15 mM, NaHCO3 35 mM, pH 9,6
Tampón cloruro de guanidinio	Tris-HCl 50 mM pH 8, cloruro de guanidinio 4 M, glicerol 5 % (v/v)
Tampón de carga de ADN (6x)	Azul de bromofenol 0,25 % (m/v), sacarosa 40 % (m/v)
Tampón de diálisis-1	Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 250 mM, TCEP 1 mM
Tampón de diálisis-2	Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 0,05 mM, TCEP 0,1 mM, sarcosilo 0,06 %
Tampón de dilución de nanopartículas	Tris-HCl 10 mM, pH 8,2
Tampón de dilución de reactivo de captura	Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, sacarosa 5 % (m/v), azida sódica 0,095 % (m/v)
Tampón de dilución de reactivos reveladores	Tris-HCl 25 mM pH 7,5
Tampón de elución de glutatión	PBS, glutatión 10 mM
Tampón de elución de proteína A	Ácido acético 0,58 % (v/v), NaCl 0,15 M
Tampón de elución de proteína G	Glicina-HCl 0,1 M pH 2,6
Tampón de elución IMAC	Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 500 mM, imidazol 500 mM
Tampón de equilibrado de cloruro de guanidinio	Tris-HCl 50 mM pH 8, ClGn 4 M
Tampón de equilibrado IMAC	Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 500 mM, pudiendo ser complementado con imidazol 20 mM
Tampón de lavado-1	Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 50 mM, TCEP 1 mM, EDTA 0,5 mM, glicerol 5 % (v/v), Tritón X-100 1 % (v/v)
Tampón de lavado-2	Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 1 M, 5 % glicerol (v/v)
Tampón de lavado de látex	MES 10 mM pH 6
Tampón de muestra de proteínas desnaturalizantes (5x)	Tris-HCl 80 mM pH 6,8, β-mercaptoetanol 5 % (v/v), SDS 2 % (m/v), glicerol 10 % (v/v), azul de bromofenol 0,01 % (m/v)
Tampón de resuspensión	Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 50 mM, TCEP 1 mM, EDTA 0,5 mM, glicerol 5 % (v/v)
Tampón de transferencia	Tris 0,25 M, glicina 1,92 M
Tampón electrolito	Tris-HCl 25 mM pH 8,9, glicina 192 mM, SDS 1 % (m/v)
Tampón fosfatasa alcalina	Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl2 5 mM
Tampón TAE	Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM, pH 8,4
Tampones de impresión	Protein Printing Buffer (Arrayit) SciSpot Protein D1 (Scienion)

III. 2. MÉTODOS

III. 2. 1 Condiciones de los cultivos celulares

Los detalles de los medios de cultivo que se indican a continuación se recogen en la Tabla III.1.

III. 2. 1. 1 Bacterias

Las cepas bacterianas se propagaron a 37 °C y agitación de 225 rpm, en medio Luria-Broth (LB) conteniendo el antibiótico selectivo según el vector utilizado (Tabla III.6). Para la obtención de medio sólido, se añadió Bacto™ Agar a una concentración final de 15 g/l. Además, el medio superóptimo con represión por catabolito (S.O.C.) se utilizó para incrementar la eficiencia del proceso de transformación.

III. 2. 1. 2 Células de insecto

Ambas líneas celulares de insecto se mantuvieron en cultivo en suspensión a 27 °C y agitación orbital de 125 rpm.

Las células Sf9 se cultivaron en medio Grace, suplementado con 8 % (v/v) de suero fetal bovino inactivado (56 °C, 30 min), 0,1 % (m/v) de plurónico y 50 μg/ml de gentamicina. En el caso de las células Sf900, se propagaron en medio Sf-900™ II SFM 1X, suplementado con 0,1 % de plurónico y 50 μg/ml de gentamicina.

III. 2. 1. 3 Células de mamífero

Las células HEK-293-F se cultivaron en medio Freestyle™ 293 a 37 °C, agitación de 135 rpm y 8 % (v/v) de CO_2.

Por otro lado, las células Sp2/0-Ag14, así como las células de hibridoma, se incubaron a 37 °C y 5 % (v/v) CO_2. En la propagación se utilizó medio DMEM o medio *Hybridoma-SFM* (suplementado con 5 % (v/v) de suero fetal bovino inactivado y antibióticos y antimicóticos). En ocasiones, el cultivo se suplementó también con HAT.

III. 2. 2 Clonación de los genes codificantes de las proteínas de interés

III. 2. 2. 1 Amplificación del gen sintético

La amplificación de los genes sintéticos (Tabla III.3) se realizó mediante PCR. Para ello, se usaron los oligonucleótidos específicos directo y reverso de cada gen (Tabla III.4). En el caso de los productos de la PCR que iban a ser clonados mediante métodos clásicos, los oligonucleótidos incluyeron dianas de enzimas de restricción en los extremos del gen. La enzima utilizada fue la Fast-Start DNA polimerase (Roche) y los parámetros base fueron los siguientes: 95 °C, 4 min; 25 ciclos [95 °C, 30 seg; Tm, 30 seg; 72 °C, 50 seg]; seguido de una extensión final de 72 °C, 10 min. Como criterio general, la elección de la temperatura de anillamiento (Tm) de la reacción se escogió disminuyendo 5–10 °C la Tm de los cebadores empleados. Para las parejas de oligonucleótidos 3_D/5_R y 15_D/16_R se llevó cabo un paso previo de optimización de la Tm, debido a la diferencia de longitud y contenido de guanina y citosina entre ambos oligonucleótidos. Cada reacción se realizó en un volumen final de 50 μl, preparando las mezclas de la PCR según las indicaciones del fabricante de la enzima.

III. 2. 2. 2 Visualización y purificación de los productos de la PCR

El ADN se separó utilizando geles de agarosa al 0,8–1 % (m/v) en tampón TAE 0,5x, suplementado con GelRed® (Biotium) a una dilución de 1/20.000. Las muestras se prepararon añadiendo el tampón de carga de ADN a una relación en volumen muestra:tampón de 5:1. La separación se realizó en tampón TAE 0,5x a un voltaje constante de 100 V. Tras la electroforesis, las bandas se visualizaron en un transiluminador de luz UV (Gel Logic 2200 Digital Imaging System, Kodak), utilizando un software de tratamiento de imágenes (Kodak Molecular Imaging, Kodak).

En las reacciones en las que se observó bandeo inespecífico, la banda del tamaño esperado se escindió previamente de un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1 % (m/v) con una cuchilla estéril. Los productos de la PCR se purificaron empleando el kit NZYGelpure (NZYtech).

III. 2. 2. 3 Clonación mediante enzimas de restricción

Para la clonación de los genes en el vector pCMV6-AC-FC-S, los productos de la PCR y los vectores se digirieron con enzimas de restricción (AscI, XhoI y NotI,

ThermoFisher), siguiendo las condiciones recomendadas por la casa comercial de las enzimas. Posteriormente, se realizó una diálisis en membrana (MF-Millipore™, 0,025 µm, Merck) frente a H_20 milli-Q, durante 30 min. Esta diálisis también se utilizó en las digestiones dobles en las que los tampones de las dos enzimas empleadas eran diferentes. A continuación, la ligación se llevó a cabo con un kit de ligación rápida de ADN (Roche), utilizando 100 ng del plásmido digerido, una relación molar 1:2 o 1:5 de vector:inserto y 5 U de la ADN ligasa T4. El producto de ligación se utilizó para transformar células competentes de *E. coli*.

III. 2. 2. 4 Clonación mediante el sistema Gateway®

La tecnología Gateway® (ThermoFisher) facilita la subclonación de un gen en múltiples vectores de expresión, a partir de la generación de un único vector, denominado de forma general vector de entrada (Figura III.1).

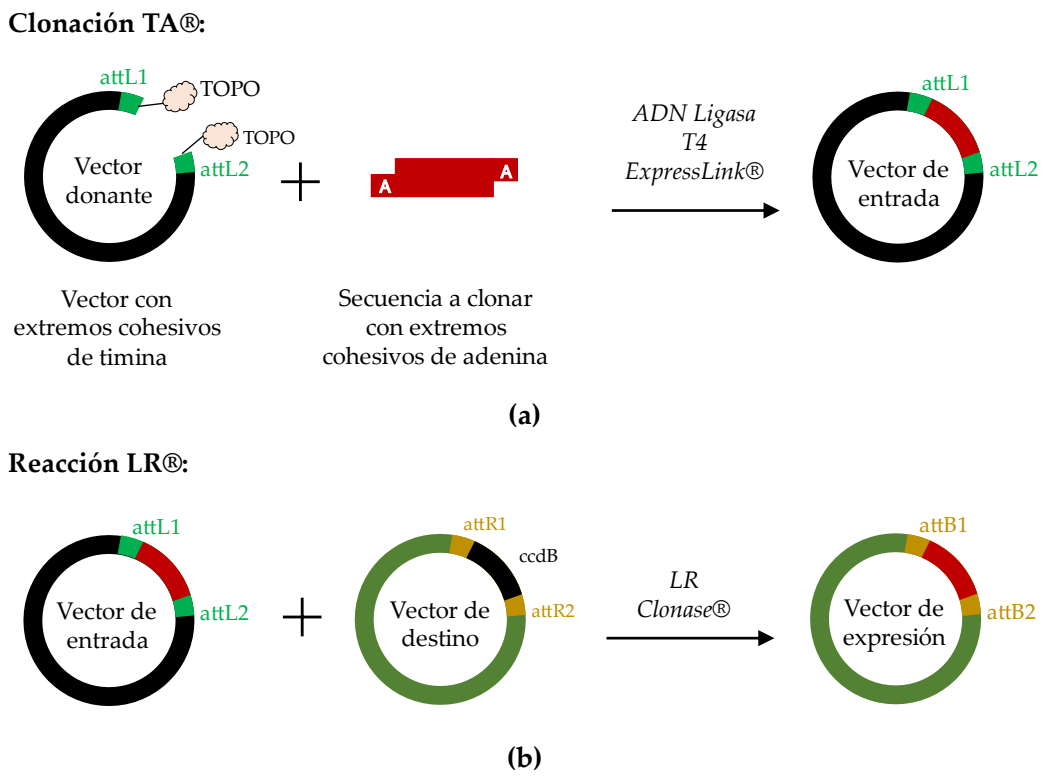


Figura III.1. Reacciones del sistema de clonación Gateway® (ThermoFisher). (a) Reacción TA®; **(b)** Reacción LR®.

En primer lugar, los productos de la PCR obtenidos (apartado III. 2. 2. 1) se clonaron en el vector donante pCR™8/GW/TOPO™. Para ello, se siguieron las indicaciones del kit comercial de **clonación TA®** (ThermoFisher), obteniéndose así los vectores de entrada pCR™8/GW/TOPO™/gen de interés (vector de entrada). Seguidamente, se realizó una recombinación homóloga entre el vector

pCR™8/GW/TOPO™/gen de interés y el vector de destino correspondiente (pDEST™17, pDEST™15, pAcHLTA/GW o pAcGP67/GW). La recombinación se realizó mediante una **reacción LR®** (ThermoFisher), siguiendo las indicaciones del fabricante.

III. 2. 2. 5 Aislamiento de clones

Cepas químicamente competentes de *E. coli* (descritas en el apartado III.1.1.1) se **transformaron** con el plásmido correspondiente, siguiendo las recomendaciones de la casa comercial de las células utilizadas. Para la transformación con el producto resultante de la ligación TA® se empleó la cepa One Shot® Mach1™ T1 y para el resto de las construcciones, la cepa NZY5α. La transformación se realizó mediante choque térmico, incubando la mezcla durante 10 min en hielo, seguido de 30 s a 42 °C y 10 min en hielo. Posteriormente, se añadieron 250 µl de medio S.O.C. y se incubó 1 h a 37 °C, con agitación de 225 rpm. Transcurrido este tiempo, las células transformadas se sembraron en LB con el antibiótico de selección correspondiente y se incubaron durante toda la noche a 37 °C.

Al día siguiente, se procedió al **cribado de las colonias** mediante PCR. Para ello, se utilizó la enzima ADN polimerasa (Biotools) y los mismos parámetros indicados en el apartado III. 2. 2. 1, pero incrementando el número de ciclos a 35. En los casos de clonación dirigida, se empleó la pareja de oligonucleótidos específicos utilizada para la amplificación del gen sintético (Tabla III.4). Por el contrario, en caso de tener que comprobar la orientación del inserto, se utilizó un cebador general del plásmido (Tabla III.5) y uno específico complementario al otro extremo del gen (Tabla III.4). Los productos de la PCR se separaron y visualizaron, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado III. 2. 2. 2. La presencia de banda al tamaño esperado indicó que la colonia contenía el plásmido recombinante de interés (clon positivo).

III. 2. 2. 6 Amplificación, purificación y secuenciación del plásmido recombinante

Las réplicas correspondientes a los clones positivos se **crecieron** en medio LB, con el antibiótico de selección correspondiente. El cultivo se incubó a 37 °C, 225 rpm, durante toda la noche. Al día siguiente, la **purificación del plásmido** se llevó a cabo empleando el kit NZYMiniprep (NZYTech) o Plasmid Plus Maxi (Qiagen), siguiendo las indicaciones de los fabricantes. Los plásmidos recombinantes purificados se **cuantificaron** mediante la medida de su absorbancia a 260 nm,

utilizando el espectrofotómetro NanoDrop™ One (Thermo Scientific). La **secuencia** de los plásmidos recombinantes se obtuvo mediante el método de secuenciación Sanger (Servicio externo de Eurofins Genomics). Para el análisis de las secuencias se utilizó el software Geneious versión 2021.1.1.

Además, para mantener los clones positivos, los cultivos se mezclaron con 20 % de glicerol (v/v) y se almacenaron a -80 °C.

III. 2. 3 Expresión de proteínas recombinantes

Dependiendo de la naturaleza de la proteína de interés, se utilizaron distintos sistemas de expresión recombinante. Las construcciones empleadas, así como las formas de las proteínas expresadas en cada caso, se detallan en la Tabla III.7.

III. 2. 3. 1 Expresión en bacterias

Las proteínas **9GL, eGFP y mCherry** se expresaron en *E. coli*. Para ello, células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) One Shot™ se **transformaron** con 10 ng del plásmido de expresión recombinante generado, según el procedimiento descrito en el apartado III. 2. 2. 5. Posteriormente, se realizó el preinóculo para 4 colonias y el cultivo se incubó a 37 °C, 225 rpm, durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, se escaló el cultivo diluyendo las células en el mismo medio hasta una DO a 600 nm de 0,1 UA. El cultivo diluido se incubó a una temperatura inicial de 37 °C y 225 rpm. En los casos en los que la temperatura de expresión fue menor de 37 °C, esta se disminuyó progresivamente hasta alcanzar la temperatura deseada. El cultivo se mantuvo hasta conseguir una DO a 600 nm de 0,5–0,6 UA. En este momento, se **indujo la expresión** con 0,2 % de arabinosa y se incubó a 37 °C, 25 °C o 18 °C, según la temperatura de expresión, y 225 rpm. En el caso de los cultivos incubados a 25 °C o 37 °C, se tomó una muestra de 1 ml de cultivo cada hora, durante un total de 3 h, para el estudio de la **cinética**. Mientras que, para la temperatura más baja, se analizó la expresión a un tiempo único, transcurrida la incubación durante toda la noche.

Para **fraccionar el cultivo celular**, las muestras recogidas a los distintos tiempos se centrifugaron a 3.000 rpm, 10 min, 4 °C. El precipitado, correspondiente al extracto total resultante, se resuspendió en 100 µl de tampón de resuspensión.

Por otra parte, para la obtención de la fracción soluble (FS) e insoluble (FI), los precipitados celulares a tiempos finales se resuspendieron en tampón de resuspensión a una relación de 10 ml/g de precipitado. Posteriormente, se añadió lisonasa (Lysonase™, Merck) a una relación 20 µl/g precipitado, seguido de un paso

de sonicación (3 pulsos de 15 s, a 40 % de potencia, usando el homogeneizador modelo 3000, Biologics). La mezcla se incubó a Ta, 15 min, en agitación suave y se repitió el paso de sonicación. A continuación, se añadió Tritón X-100 al 1 % y se incubó a Ta, 30 min en agitación suave para finalizar la lisis celular. La mezcla se centrifugó a 10.000 xg, 15 min, a 4 °C, obteniéndose así la FS y la FI (precipitado). Finalmente, para su posterior purificación, la FS se dializó en tampón de diálisis-1, a 4 °C, durante toda la noche.

III. 2. 3. 2 Expresión en células de insecto

Las proteínas **9GL, CD2v, eGFP y mCherry** se expresaron en células de insecto, utilizando el sistema de baculovirus. A continuación, se describen los pasos seguidos para la producción de las proteínas de interés en este sistema de expresión:

- **Generación y aislamiento del baculovirus recombinante:**

Los baculovirus recombinantes se obtuvieron por **cotransfección** del plásmido recombinante de expresión que contenía el gen de interés y el genoma del baculovirus parental (BacPAK6) digerido con Bsu36I (Figura III.2). De este modo, se introdujo el gen de interés entre la ORF603 y la ORF1629 del genoma parental, eliminando así el gen *lacZ* y permitiendo la diferenciación posterior del virus parental del recombinante.

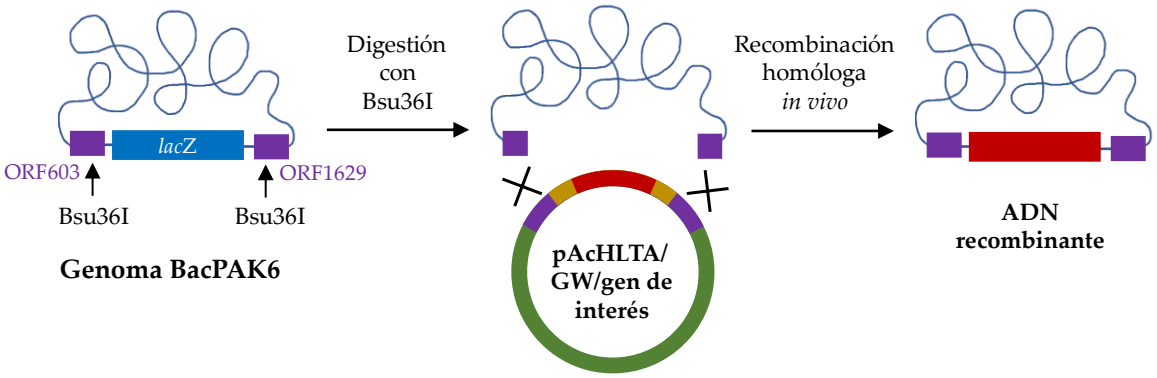
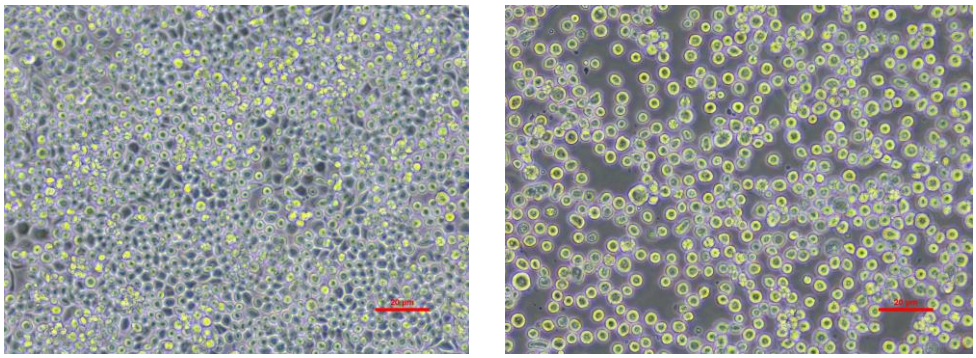


Figura III.2. Generación del genoma recombinante de baculovirus. Recombinación homóloga del BAcPAK6 digerido con Bsu36I y el pAcHLTA/GW/gen de interés (plásmido recombinante de expresión), para la obtención del ADN recombinante.

Brevemente, la cotransfección se llevó a cabo en células Sf9, utilizando el sistema jetPEI® (Polyplus) y siguiendo las indicaciones de la casa comercial. La mezcla de la transfección se incubó durante 20 min a Ta y se añadió sobre $2 \cdot 10^6$ de células Sf9 sembradas en una placa T-75 (Corning), junto con 1,5 ml de medio de cultivo. Los frascos se incubaron durante 5 h a 27 °C, agitando ocasionalmente.

Transcurrido ese tiempo, se eliminó la mezcla de transfección y se añadieron 5 ml de medio de cultivo. El cultivo se mantuvo a 27 °C hasta observar morfología típica de infección (aproximadamente 7 días) al microscopio óptico: menor densidad celular, células y núcleos de mayor tamaño, así como membrana celular irregular (Figura III.3).



(a) **(b)**

Figura III.3. Imagen al microscopio óptico de células Sf9. (a) células no infectadas; **(b)** células infectadas. Imágenes tomadas al microscopio invertido de campo claro, a 10x. La línea roja indica la escala (20 μm).

Posteriormente, para **aislar los clones del baculovirus recombinante**, el cultivo obtenido se centrifugó a 3.000 rpm, 10 min a 4 °C. A continuación, se hicieron diluciones seriadas del sobrenadante resultante, con las que se infectaron $1{,}5 \cdot 10^6$ células Sf9 sembradas en placas de cultivo de 6 pocillos de 20 mm de diámetro (Corning). El virus se dejó adsorbiendo a 27 °C durante 1,5 horas. Transcurrido este tiempo, se retiró el inóculo y se añadió una mezcla 1:1 de medio de cultivo y agarosa de bajo punto de fusión al 3 % (m/v). La mezcla se dejó solidificar a 27 °C y se añadió 1 ml de medio de cultivo por encima de la agarosa. A los 7–10 días, tras observar un efecto citopático claro al microscopio óptico, como se muestra en la Figura III.3, las placas de lisis se tiñeron con una solución de tinción que contenía rojo neutro y X-Gal. Consecutivamente, se seleccionaron 4–6 placas de lisis de color blanco ya que, en la recombinación, se elimina el gen *lac*Z que codifica la β-galactosidasa (ver apartado III. 1. 3). La agarosa se dejó eluyendo en 0,5 ml de medio de cultivo a 4 °C, durante toda la noche.

Con cada eluido se infectaron $2 \cdot 10^6$ células Sf9 sembradas en una placa de cultivo de 60 mm de diámetro (Corning) y se incubaron a 27 °C. Pasados 7–10 días aprox., cuando se observó efecto citopático avanzado, el cultivo se centrifugó a 3.000 rpm, 10 min a 4 °C. El precipitado celular obtenido se empleó para analizar de

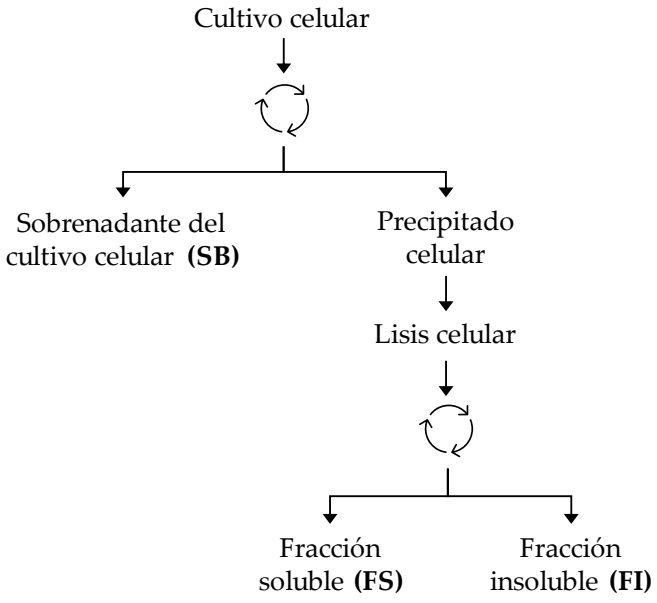
forma preliminar la expresión de la proteína de interés y el sobrenadante correspondió al inóculo primario.

- **Generación de inóculo de alto título del baculovirus recombinante:**

Un total de $100 \cdot 10^6$ células Sf9/Sf900, a una densidad de $1 \cdot 10^6$ células/ml, se infectaron con 100 µl del inóculo primario. El cultivo se incubó a 27 °C y agitación de 125 rpm. A los 10–15 dpi, cuando más del 95 % de las células estaban lisadas, se centrifugó el cultivo a 3.000 rpm durante 10 min, a 4 °C. El sobrenadante resultante correspondió al **inóculo viral de alto título**. Posteriormente, este se tituló mediante recuento de placas de lisis formadas en medio sólido gelificado, según lo descrito en el apartado anterior. El resultado de la **titulación** se expresó en unidades formadoras de placa/ml (ufp/ml). Este inóculo de alto título se empleó para la expresión de la proteína de interés.

- **Expresión y fraccionamiento del cultivo celular de células de insecto:**

El inóculo obtenido se utilizó para infectar $100–500 \cdot 10^6$ células Sf9/Sf900, a una densidad de $1 \cdot 10^6$ células/ml y mdi variable entre 0,1 y 2. El cultivo se recogió a diferentes tiempos (3–5 dpi), centrifugando a 3.000 rpm durante 10 min, a 4 °C, separando así el precipitado celular del sobrenadante del cultivo celular (SB). El precipitado celular obtenido se lisó en tampón bicarbonato a una relación de 1 ml/$20 \cdot 10^6$ células e incubando a 4 °C, 1 h. La suspensión resultante se centrifugó a 10.000 rpm, 5 min a 4 °C, obteniéndose así la FS y la FI (precipitado). A continuación, la FI se resuspendió en 500 µl de PBS y se sonicó en 2 ciclos de 15 seg, al 50 % de potencia. En el siguiente esquema se resume el procesamiento del cultivo celular:



III. 2. 3. 3 Expresión en células de mamífero

Las proteínas **pEP153R (genotipo I y II) y CD2v** se expresaron en el sistema de mamífero utilizando los vectores de expresión recombinante producidos. Las construcciones de plásmidos empleadas, así como las formas de las proteínas expresadas, se detallan en la Tabla III.7. Para ello, el plásmido recombinante se utilizó para **transfectar** 30–50·10^6 de células HEK-293-F, a una densidad de 1–1,2·10^6 células/ml y relación 1 μg ADN/ml de cultivo. Para ello, se utilizó el reactivo FectoPRO® (Polyplus), siguiendo las indicaciones recomendadas por el fabricante. Se recogió el mismo volumen de cultivo a los 3, 4 y 5 días postransfección (dpt), siendo necesario en algunos casos extender la cinética hasta los 6 y 7 dpt.

Para el **fraccionamiento del cultivo**, este se centrifugó a 4.500 rpm, 10 min a 4 °C, separando así el SB de las células. Posteriormente, las células se lisaron utilizando tampón bicarbonato a una relación 1 ml/20·10^6 células. El lisado resultante se centrifugó a 10.000 rpm, 10 min, a 4 °C, separando así la FS de la FI. A continuación, la FI se resuspendió en PBS a la misma relación indicada para el tampón bicarbonato y, posteriormente, la suspensión se sonicó en 2 ciclos de 10 seg, al 50 % de potencia.

III. 2. 4 Solubilización y purificación de proteínas recombinantes

En los casos en los que, tras el fraccionamiento celular, la proteína se detectó únicamente en la FI, se procedió a una solubilización previa a la purificación. La purificación se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad, según la etiqueta de cada forma recombinante.

III. 2. 4. 1 Solubilización

La solubilización se realizó mediante el uso de detergente (sarcosilo) o una concentración elevada de sal (cloruro de guanidinio).

III. 2. 4. 1. 1 Solubilización mediante sarcosilo

La FI obtenida se lavó dos veces con tampón de lavado-1 del protocolo de sarcosilo y otras dos veces en tampón de resuspensión, para eliminar los restos de Tritón X-100. En cada lavado se centrifugó a 8.000 xg, 15 min a 4 °C y se recogió tanto el sobrenadante como el precipitado. Tras los lavados, el precipitado se resuspendió en tampón de resuspensión, a una relación de 10 ml/0,5 g de precipitado. Tras sonicar 30 seg a 40 % de potencia, se añadió sarcosilo a

concentraciones crecientes (1–5 %), hasta la completa solubilización. La proteína solubilizada se dializó en tampón de diálisis-2, a 4 °C, durante toda la noche.

III. 2. 4. 1. 2 Solubilización mediante cloruro de guanidinio

Para obtener la proteína solubilizada mediante cloruro de guanidinio, la FI se lavó con tampón de lavado-2. Tras centrifugar a 12,000 xg, 5 min, a 4 °C, el precipitado resultante se resuspendió en tampón cloruro de guanidinio, a una relación de 1 ml/0,5 g de precipitado. La suspensión se incubó a Ta, con agitación suave. Transcurridos 45 min, se centrifugó a 12.000 xg, 10 min a 4 °C, separando así la fracción solubilizada del precipitado restante.

III. 2. 4. 2 Purificación de proteínas por afinidad

III. 2. 4. 2. 1 Cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC)

Las proteínas con etiqueta 6xHis se purificaron utilizando la resina High density metal free (ABT). Para la absorción del metal se siguieron las indicaciones del fabricante, cargando la resina con una solución de $NiSO_4$. Posteriormente, la columna se equilibró con tampón de equilibrado IMAC. La FS o FI solubilizada se aplicó a la columna (pudiendo ser incubada la mezcla a 4 °C durante toda lo noche, en agitación) y se recogió por gravedad el material no retenido. A continuación, se realizó un lavado de la columna utilizando el mismo tampón de equilibrado. Tras el lavado, la proteína se eluyó con el tampón de elución IMAC. Los eluidos se dializaron frente al tampón de diálisis-1, a 4 °C, en agitación, durante toda la noche.

En el caso de la proteína solubilizada por cloruro de guanidinio, la columna se equilibró con el tampón de equilibrado de cloruro de guanidinio, y la diálisis se hizo frente al mismo tampón, disminuyendo progresivamente la concentración de sal mediante diálisis sucesivas.

III. 2. 4. 2. 2 Cromatografía de afinidad a proteína A y/o proteína G

Las proteínas con etiqueta Fc de IgG de ratón se purificaron mediante una columna de afinidad de proteína G (Protein G Sepharose™ Fast Flow, Cytiva) o proteína A (rProtein A Sepharose™ Fast Flow, Cytiva). El SB se aplicó directamente a la columna, mientras que las FS se diluyó previamente en un factor 1/10 en el mismo tampón de lisis. Como tampón de equilibrado y lavado de la purificación se utilizó PBS. La elución se realizó con 3 volúmenes del tampón de elución

correspondiente. Tras la neutralización de los eluidos con Tris saturado, estos se dializaron en PBS a 4 °C, en agitación, durante toda la noche.

En el caso de los AcM, estos se purificaron con una columna pre-empaquetada (rProteína A/Proteína G GraviTrap™, Sigma), siguiendo el protocolo de la casa comercial.

III. 2. 4. 2. 3 Cromatografía de afinidad a glutatión

En el caso de proteínas con etiqueta GST, se utilizó una columna comercial con resina de glutatión (GST GraviTrap, GE Healthcare). La columna se equilibró con PBS y se añadió la fracción celular correspondiente. Posteriormente, tras un lavado con PBS, se eluyó la proteína con 3 volúmenes de columna de tampón de elución de glutatión. Los eluidos se dializaron en tampón de diálisis-1, a 4 °C, en agitación, durante toda la noche.

III. 2. 5 Técnicas de análisis de proteínas

III. 2. 5. 1 Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)

Los geles de poliacrilamida se prepararon a una concentración de acrilamida entre 11–15 % (v/v), según la masa molecular esperada para la proteína a analizar. Además, se utilizó un gel concentrador a una concentración constante del 4 % (v/v). Para la electroforesis, las muestras se prepararon añadiendo 1/5 de su volumen de tampón de muestra de proteínas desnaturalizantes 5x. Las muestras se incubaron a 100 °C, durante 5 min y se cargaron en los pocillos del gel, junto a un marcador de masa molecular (Precision Plus Protein™ dual color standards, Bio-Rad). La electroforesis se realizó a 200 V, durante 40–50 min en tampón electrolito.

III. 2. 5. 2 Tinciones de SDS-PAGE y cuantificación de proteínas

Para visualizar las proteínas separadas, los geles de poliacrilamida se tiñeron con azul de Coomassie o plata. Para la tinción con azul de Coomassie, los geles se incubaron en solución de teñido durante 5–20 min, a Ta y en agitación. Seguido de una incubación en solución de desteñido, a Ta, durante un tiempo variable según cada caso. Respecto a la tinción de plata, se siguió el protocolo comercial del kit PlusOne Silver Staining Kit (número de protocolo 71-7177-00 AL, GE-Healthcare), con ligeras modificaciones. Para ambas tinciones, los geles se lavaron en H_2Od y se secaron al vacío (Scie-PLAS).

Una vez teñido el gel, la cuantificación de las proteínas se llevó a cabo mediante densitometría, utilizando una curva patrón con cantidades conocidas de BSA (0,5, 1,0 y 1,5 µg) y el programa de análisis de imagen TotalLab 1D, versión 14.0 (TotalLab). El nivel de pureza también se determinó mediante este método.

En el caso de obtener proteínas con una pureza cercana al 100 %, la cuantificación también se realizó mediante la medida de su absorbancia a 280 nm, usando el equipo NanoDrop™ One (Thermo Scientific), y aplicando la ley de Lambert-Beer [$A = cl\varepsilon$; donde A es la absorbancia de la muestra, c la concentración del cromóforo, l la longitud del paso óptico que contiene la muestra, y ε, el coeficiente de extinción molar]. El valor del ε para cada una de las formas de las proteínas recombinantes se indica en la Tabla III.15.

Tabla III.15. Coeficientes de extinción molar (ε) de las versiones recombinantes de las proteínas de interés cuantificadas por absorbancia.

Proteína	Forma	ε $(mg/ml)^{-1}\cdot cm^{-1}$
pEP153R genotipo II	pEP153R II-TEV-Fc pEP153R II-Fc	1,54
pEP153R genotipo I	pEP153R I-Fc	1,63
eGFP	His-eGFP (*E. coli*)	0,88
	GST-eGFP	1,31
	His-eGFP (Sf9)	0,72
mCherry	His-mCherry (*E. coli*)	1,30
	His-mCherry (Sf9)	1,11

Además, para proteínas con un nivel de pureza inferior al 80 %, también se cuantificó la cantidad de proteína total mediante el método de ácido bicinconínico (BCA; Pierce™ BCA Protein Assay Kits, ThermoFisher), siguiendo el protocolo del fabricante.

III. 2. 5. 3 Análisis de secuencias

El alineamiento múltiple entre secuencias de las **proteínas pEP153R y CD2v** se realizó con el algoritmo Clustal Omega 1.2.2. A continuación, el árbol filogenético se construyó con la herramienta Geneious Tree Builder.

Las secuencias se obtuvieron en la base de datos "Nucleotide" del NCBI [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/]. En el caso del alineamiento de la pEP153R, se hizo una búsqueda más exhaustiva de todas las secuencias disponibles en la base de datos [búsqueda: "EP153R OR C-type lectin-like protein", filtro por organismo:

"African Swine Fever Virus", acceso: 27/05/2024]. Tras lo cual se extrajo la región codificante (CDS) de cada secuencia correspondiente al gen de interés. Posteriormente, se realizó la transcripción y traducción de los genes.

Para todos los análisis de secuencias descritos anteriormente, se empleó el programa Geneious Prime (versión 2021.1.1).

Además, para predecir el perfil hidrofóbico de las proteínas se utilizó la escala de Kyte y Doolittle, disponible en el servidor de acceso gratuito en línea ExPASy [https://web.expasy.org/protscale/]. Por otro lado, los sitios potenciales de glicosilación se determinaron con los algoritmos NetNGlyc 1.0 y NetOGlyc 4.0, disponibles en la herramienta en línea de acceso libre DTU Health Tech [https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetNGlyc-1.0/].

III. 2. 6 Producción de anticuerpos monoclonales

III. 2. 6. 1 Inmunización de ratones

Para la obtención de anticuerpos monoclonales, se utilizaron 5 ratones hembra BALB/c de edad comprendida entre 8 y 12 semanas. Durante las inmunizaciones, los animales se mantuvieron a 22–24 °C y 40 % de humedad, con ciclos de 12 h luz-oscuridad y alimentación *ad libitum*. Cuatro de los cinco ratones se inmunizaron con la proteína His-eGFP (Sf9) y el quinto ratón se utilizó como control. Las inyecciones se realizaron vía intraperinoteal. Para la primera inmunización, se utilizaron 50 µg del inmunógeno en adyuvante completo Freund (Sigma), emulsionado mediante sonicación. Para las siguientes 3 inmunizaciones, separadas 2 semanas entre ellas, la misma cantidad de antígeno se emulsionó en adyuvante incompleto de Freund (Sigma). El animal control siguió el mismo procedimiento, pero se utilizó PBS estéril en lugar del inmunógeno.

Transcurrida una semana de la tercera y cuarta inmunización, se extrajo sangre a los ratones a través de una pequeña incisión en la cola. El suero se obtuvo tras centrifugar la sangre a 15.000 rpm, 10 min a Ta. A continuación, se comprobó el título de anticuerpos mediante ELISA indirecto frente al antígeno diana, según el procedimiento descrito en el apartado III. 2. 7. 2. 1.

III. 2. 6. 2 Fusión celular y selección de hibridomas específicos

Se seleccionaron los dos ratones con mayor título de anticuerpos y a continuación se inmunizaron durante tres días consecutivos con 50 µg de la

proteína His-eGFP (Sf9), disuelta en PBS. Al día siguiente, estos dos animales se sacrificaron mediante inhalación de CO_2 y se extrajeron sus bazos. Para la obtención de los AcM, se realizó una fusión celular entre la línea celular Sp2/0-Ag14 y las células de bazo de los ratones inmunizados, a una relación celular de 1:4, respectivamente. La preparación de los dos tipos celulares y el procedimiento de la fusión se realizaron siguiendo el protocolo descrito previamente por Nowinski *et al.* (1979) [151]. Las células resultantes de la fusión se diluyeron a $5 \cdot 10^6$ células/ml en medio Hybridoma-SFM base y se sembraron en placas de cultivo celular de 96 pocillos (Corning), añadiendo 100 µl de la suspensión/pocillo. Las placas se incubaron a 37 °C y 5 % (v/v) de CO_2. Transcurridas 24 h, se añadió 100 µl/pocillo de medio Hybridoma-SFM base, suplementado con 2X HAT y las placas se incubaron de igual forma a la antes indicada. Cada 48 horas, hasta el momento del cribado, el medio se reemplazó con medio Hybridoma-SFM base con 1X HAT.

Transcurridos 15 días, la producción de anticuerpos en los distintos pocillos se evaluó mediante ELISA indirecto frente a la proteína His-eGFP (Sf9) (apartado III. 2. 7. 2. 1). En paralelo, se analizó la reactividad frente a un antígeno negativo, producido y tapizado en las mismas condiciones que el antígeno diana. Por otro lado, se utilizó sangre extraída el día del sacrificio como control positivo de suero en el ensayo, mientras que, como control negativo, se empleó el medio de cultivo. Tras la lectura, se consideraron como positivos aquellos sobrenadantes con una diferencia de DO a 405 nm igual o mayor que 1,0 UA, entre la obtenida frente al antígeno positivo y el negativo. Los hibridomas seleccionados se resuspendieron y diluyeron a una concentración final de 50 células/pocillo en medio Hybridoma-SFM base con 1X HT y suplemento de clonación y fusión de hibridomas. Cada 48 h se realizaron cambios del mismo medio y se repitió la valoración descrita previamente cada 15 días, esta vez únicamente frente al antígeno positivo. Los pocillos identificados como positivos se fueron diluyendo progresivamente hasta obtener una concentración final de 1–2 células de hibridoma/pocillo.

III. 2. 6. 3 Purificación y marcaje de los anticuerpos monoclonales

Los hibridomas aislados a 1–2 células/pocillo se expandieron en placas de cultivo de 6 pocillos (Corning), luego en placas Petri de 100 mm^2 (Corning) y finalmente en frascos de cultivo T-75 (Corning). Algunos de los cultivos se utilizaron para la producción de viales de estocaje, centrifugando los cultivos a 200 xg y resuspendiendo el precipitado celular en 1:1 medio Hybridoma-SFM con antibióticos:HyCryo-STEM. La suspensión resultante se almacenó en alícuotas de

0,5–1 ml, a -70 °C, 24 h. Trascurrido este tiempo, los viales se trasladaron a nitrógeno líquido y se mantuvieron en un congelador isotérmico (V3000-AB, Custom Biogenic Systems). Por otro lado, el sobrenadante de los cultivos, obtenido mediante centrifugación a 485 xg, 5 min, a 4 °C, se filtró usando un Chromafil Xtra 1,0 μm (Macherey-Nagel). Posteriormente, los AcM se purificaron según lo descrito en el apartado III. 2. 4. 2. 2.

Los AcM purificados se marcaron con PO, siguiendo el protocolo descrito por Nakane y Kawaoi en 1974 [152], con ligeras modificaciones. Brevemente, los AcM se dializaron frente a tampón carbonato, durante toda la noche. La enzima PO (Roche) se diluyó en el mismo tampón que el AcM (100 μl/mg enzima) y después se añadió el mismo volumen de 10 mM $NaIO_4$. La reacción de activación se incubó durante 2 h a Ta, en oscuridad. La PO activada se añadió en una relación en masa 2:1 (AcM:PO). La reacción se concentró por centrifugación hasta los 20 mg/ml, usando un Vivaspin® 500 10 kDa MWCO (Sartorius) en ciclos de 3.000 xg, 5 min. Tras 3 h a Ta, en oscuridad, la reacción se estabilizó añadiendo 1/10 del volumen total de la solución de borohidruro, e incubando 30 min a Ta. A continuación, se dializó frente a PBS, a 4 °C, durante toda la noche y, finalmente, se añadió glicerol a una relación en volumen 1:1 para su conservación.

III. 2. 7 Inmunoensayos

III. 2. 7. 1 Inmunodetección en membranas de nitrocelulosa (western blot)

Las proteínas resueltas mediante SDS-PAGE (apartado III. 2. 5. 1) se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0,2 μm de tamaño de poro (Bio-Rad) mediante electrotransferencia semiseca. Para ello, la membrana, el gel a transferir y papeles 3MM (GE Healthcare) se humedecieron en tampón de transferencia. Tras formar el sándwich correspondiente (papel 3MM-membrana-gel-papel 3MM), se aplicó un potencial de 25 V y 2,5 A, durante 10 min, usando el equipo Trans-Blot® Turbo™ (Bio-Rad). A continuación, la membrana se incubó en solución de bloqueo a Ta, 1 h o durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente, se incubó con el AcM específico o sueros de cerdos experimentales diluidos en PBST, suplementado con 2,5 % de leche de ser necesario. En el caso de que el AcM específico no estuviese conjugado a PO, tras 3 lavados con PBST, las membranas se incubaron con un segundo anticuerpo marcado: anti-Fc de ratón-PO (1/5.000), anti-Fc de ratón-FA (1/5.000), o 1BH7-PO (1/10.000), diluidos en PBST. Finalmente, tras

otro paso de lavado, la membrana se reveló con TMB (ep(HS)TMB-mA, SDT) o tampón fosfatasa alcalina. Las reacciones se detuvieron con H_2Od.

III. 2. 7. 2 ELISA

El primer paso fue preparar las placas del ensayo, donde se inmovilizaron las proteínas recombinantes (reactivo capturador). Para ello, las proteínas se tapizaron en placas de 96 pocillos de alta o media adherencia (Corning) en tampón carbonato, a una concentración variable entre 0,1 y 10 ng/µl, trabajando en un volumen final de 50 µl o 100 µl por pocillo. El tapizado se realizó por dilución en volumen para las proteínas cuya cuantificación no fue posible. Las placas se incubaron a 4 °C, durante toda la noche. Al día siguiente, se estabilizaron con solución de bloqueo y estabilizante de ELISA durante 1 h a Ta.

A continuación, se describen los **distintos formatos de ELISA** empleados en el presente trabajo:

III. 2. 7. 2. 1 ELISA indirecto

De manera que, en un ELISA indirecto (Figura III.4), tras tapizar el antígeno en la placa de 96 pocillos, se añade la muestra problema. A continuación, se adiciona un anticuerpo anti-especie (ratón/cerdo) o proteína A/G marcados que se unen a los anticuerpos específicos presentes en la muestra. Tras la adición de un sustrato cromogénico, la señal obtenida es proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos en la muestra.

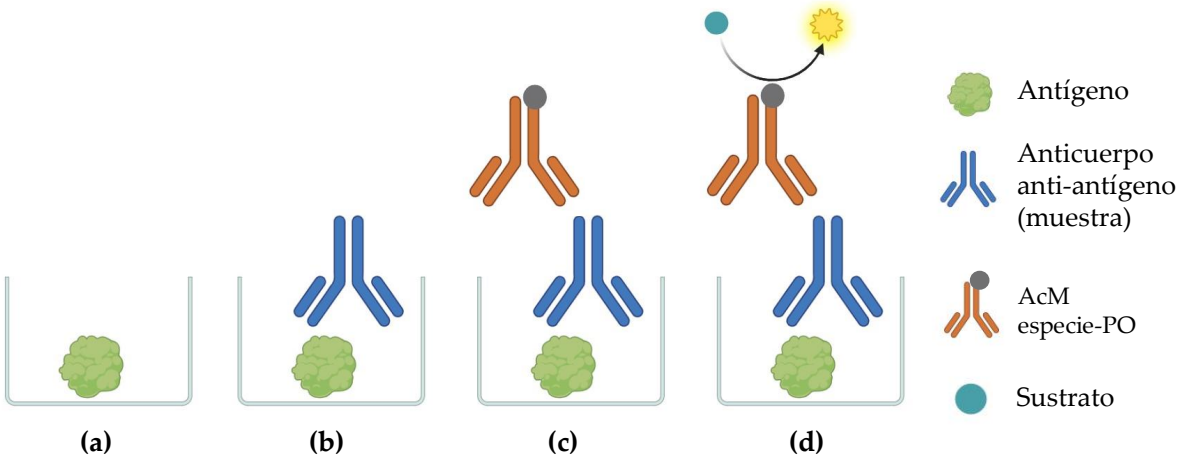


Figura III.4. Esquema de un ELISA indirecto. (a) Antígeno diana inmovilizado en un pocillo de la placa; **(b)** adición de la muestra y captura de los anticuerpos específicos; **(c)** reconocimiento de la región Fc de las IgG de cerdo o ratón por un anticuerpo monoclonal (AcM) marcado con peroxidasa (PO); **(d)** adición de un cromógeno. Esquema creado con BioRender.com.

En el presente trabajo, los pocillos tapizados con la proteína diana se incubaron con las muestras porcinas a distintas diluciones en diferentes tampones de muestra de ELISA, durante 30/60 min, a 37 °C/Ta. A continuación, se añadió como anticuerpo secundario un AcM marcado (anti-IgG de cerdo-PO o anti-Fc de ratón-PO) o proteína A/G-PO (Invitrogen) a una dilución variable entre 1/2.000 y 1/100.000, en solución estabilizante de conjugado, que se incubó 1 h a 37 °C o Ta. La reacción se reveló con los sustratos TMB (Enhanced K-Blue®, Neogen) o sal de diamonio 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS, Neogen), tras tiempos variables entre 5 y 30 min. Para detener la reacción con TMB, se utilizó H_2SO_4 0,5 M y en el caso de usar ABTS, SDS al 2 % (m/v). Seguidamente, se midió la DO a 450 o 405 nm, respectivamente, usando un espectrofotómetro de placas (SpectraMax M5, Molecular Devices). Entre cada una de las incubaciones, se realizaron 3 lavados con solución de lavado de ELISA.

En el caso de trabajar con **muestras de sangre recogidas en papel de filtro**, 2–3 gotas de sangre líquida (recogida con EDTA) se añadieron sobre papel de filtro (BioSample TFN Specimen Collection Cards, Ahlstrom-Munksjo). La muestra se dejó secar a Ta, durante toda la noche. A continuación, se hizo un disco de 6 mm de diámetro, cuyo contenido se eluyó en 250 µl del tampón de muestra del ensayo en un pocillo de una placa de 96 pocillos de media adherencia, a 4 °C, durante toda la noche. Al día siguiente, el eluido se trató como la muestra del ensayo.

III. 2. 7. 2. 2 ELISA directo

En un ELISA directo, una vez que el antígeno se inmoviliza en la placa de 96 pocillos, se añade un AcM que reconoce de forma específica al antígeno. Este AcM está marcado y la señal que se obtiene tras la adición del cromógeno es directamente proporcional a la cantidad de AcM que se une al antígeno. En este trabajo, la placa tapizada se incubó con un AcM conjugado a PO diluido en solución estabilizante de conjugado, durante 1 h, a Ta. Tras un paso de lavado, se reveló con ABTS durante 15 min.

III. 2. 7. 2. 3 ELISA de competición

En un ELISA competitivo (Figura III.5), tras la inmovilización del antígeno en las placas de 96 pocillos, se añaden a la vez dos AcM, uno sin marcar y otro marcado con PO, que compiten por unirse al antígeno tapizado. A continuación, se adiciona un sustrato cromogénico, siendo la señal obtenida inversamente proporcional a la

cantidad de AcM sin marcar unido al antígeno. Si el AcM sin marcar, o una muestra problema, se añade en un paso previo al AcM marcado, el ensayo se denomina ELISA de bloqueo.

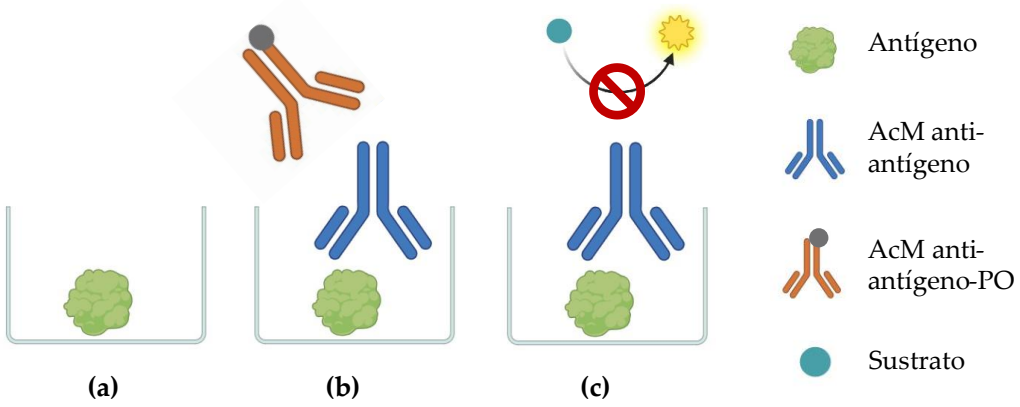


Figura III.5. Esquema de un ELISA de competición. (a) Antígeno diana inmovilizado en el pocillo de una placa; **(b)** adición de un anticuerpo monoclonal (AcM) sin marcar, a la vez que un AcM marcado con peroxidasa (PO) que reconocen al antígeno diana; **(c)** adición de un cromógeno. Esquema creado con BioRender.com.

En este trabajo, las placas tapizadas con el antígeno se incubaron con diluciones seriadas de un AcM sin marcar, partiendo de una concentración de 0,1 µg/µl en tampón de muestra DE01. Además, 25 µl de los mismos AcM conjugados a PO se añadieron a la vez, a la dilución óptima determinada mediante ELISA directo. La placa se incubó durante 1 h a Ta y, tras un paso de lavado, se reveló con ABTS durante 15 min.

III. 2. 7. 3 ELISA-microarray

Se desarrolló un formato indirecto de un ELISA-*microarray*, inmovilizando en el soporte sólido los antígenos (reactivos capturadores) y utilizando como reactivo revelador un AcM anti-IgG de cerdo marcado.

III. 2. 7. 3. 1 Impresión del microarray

Las proteínas de interés se imprimieron por duplicado en placas de alta adherencia de 96 pocillos (High Binding, Corning), usando el equipo NanoPlotter 2.1 (Gesim AG), en un espacio definido por una gradilla de 12 filas y 10 columnas (12x10). Además, se imprimió IgG de cerdo purificada (Bio-Rad) como marcador posicional de la gradilla en las posiciones (1,6), (2,10), (7,1), (12,4) y (12,8) (Figura I.6); y un AcM anti-IgG de cerdo, G1, como control del inmunoensayo.

Para la optimización de la impresión, los antígenos se imprimieron en diluciones seriadas de orden 2 desde 0,1 mg/ml a 3,1 μg/ml, en tampones de impresión comerciales. El tampón de impresión se suplementó con sarcosilo a una concentración variable de $7{,}5 \cdot 10^{-3}$–$1{,}90 \cdot 10^{-3}$ % (v/v) para los antígenos purificados, y con 0,02 % (v/v) de Tween 20 para los antígenos semipurificados. En algunos casos, se incluyó un segundo antígeno, no relacionado, coimpreso en el mismo punto a 0,05 mg/ml. El antígeno utilizado fue Der f 2, una proteína recombinante del ácaro *Dermatophagoides farinae* ya disponible en GSD Madrid, expresada en el sistema de levaduras. Cada muestra se imprimió por duplicado, usando un volumen de 2 gotas de 0,6 pl/gota en cada punto.

La impresión se realizó a 16 °C y 50 % de humedad ambiental. Las placas impresas se incubaron en la cabina del NanoPlotter en las mismas condiciones hasta la mañana siguiente (12–16 h desde la finalización de la impresión). Al día siguiente, los pocillos se lavaron tres veces con 300 μl de solución de lavado posimpresión y, a continuación, se añadió solución de bloqueo y estabilizante de ELISA, que se incubó durante 1 h, a Ta, con agitación de 500 rpm.

Cada lote de impresión (6 microplacas por lote) se validó incubando cuatro pocillos (posiciones G4, H4, A9 y B10) con una combinación de AcM frente a las etiquetas de los antígenos impresos: anti-His-PO (1/4.000), anti-Fc de ratón-PO (1/10.000), anti-GST-PO (1/10.000) y 1BH7-PO (1/10.000), diluidos en solución estabilizante de conjugado, durante 30 min, a Ta.

III. 2. 7. 3. 2 Procedimiento del inmunoensayo

Las placas impresas se incubaron con los sueros porcinos diluidos en diferentes tampones de muestra de ELISA, durante 1 h, a Ta, con 500 rpm de agitación. A continuación, se añadió como anticuerpo secundario un AcM anti-IgG de cerdo marcado con PO (1BH7-PO), a diluciones variables entre 1/20.000–1/80.000 en solución estabilizante de conjugado y se incubó durante 1 h, a Ta y 500 rpm. Finalmente, la reacción se reveló con TMB SeramunBlau® spot dark (Seramun Diagnostica). Tras 10 min, la reacción se detuvo por agotamiento del sustrato, retirando el TMB y lavando el pocillo tres veces con 300 μl de H_2Od. Entre cada una de las incubaciones, se realizaron 3 lavados consecutivos utilizando la solución de lavado de ELISA.

Antes de la lectura del ensayo, los pocillos se secaron totalmente a 37 °C durante 5 min. La captura de la imagen del *microarray* y su análisis se realizó con el

lector CLAIR™ (Sensovation AG) y su programa asociado, ArrayReader 2.6.1. El programa tomó la imagen del *microarray* en formato "TIFF" y la transformó en escala de grises con una profundidad de 16 bits. De esta forma, el rango de la intensidad de señal (IS) de gris fue de 2^0–2^{16} UA (1–65.535 UA). Como muestra la Figura III.6, el programa posicionó en la imagen la gradilla 12x10, previamente definida por el usuario (número de columnas y filas, distancia entre los puntos, dimensiones de los puntos, etc.), tomando como referencia los puntos posicionales impresos. A continuación, localizó e identificó los puntos en sus posiciones teóricas dentro de cada celda y cuantificó el nivel de intensidad de los mismos. Para ello, la imagen de cada celda se "segmentó", es decir, se definió qué píxeles de la celda se consideraban zona analizada o zona de fondo local, además de identificar irregularidades del *microarray* (motas de polvo, partículas, etc.). La IS de cada punto se calculó como la mediana de la IS de gris de los píxeles de la zona analizada menos la mediana de la IS de los píxeles de la zona de fondo local correspondiente. La IS fue directamente proporcional a la cantidad de producto de TMB depositado específicamente en los puntos y, por tanto, a la concentración de IgG específica del suero. Los niveles de IgG específica de antígeno se calcularon como la media de la IS de los puntos duplicados del correspondiente antígeno.

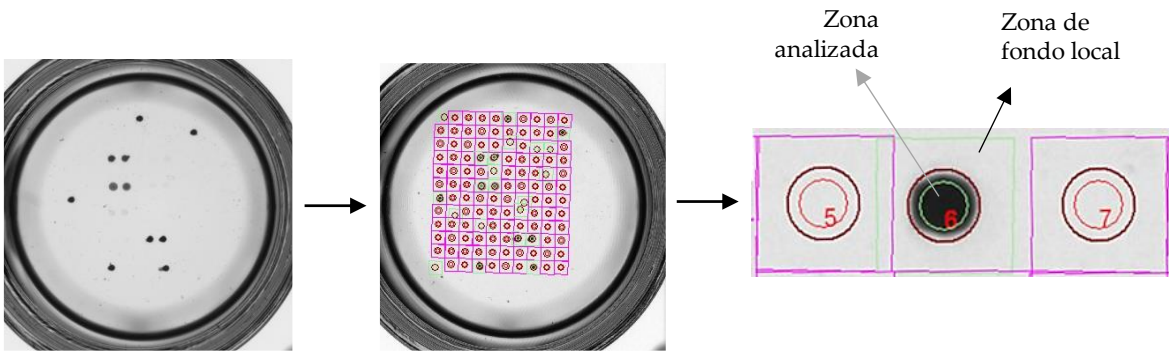


Figura III.6. Tratamiento de imagen durante la lectura del ELISA-*microarray*.

Además, se calculó la relación de señal de ruido (SNR), siguiendo la siguiente fórmula [153]:

$$\text{SNR} = \frac{\text{media de la intensidad de la señal} - \text{media de la intensidad del fondo}}{\text{desviación estándar del fondo local}}$$

Los puntos con valores de SNR inferiores a 1,3 se consideraron defectuosos o muy débiles y se eliminaron del cálculo de la media de la IS. Si ambos duplicados presentaban una SNR < 1,3, la media se anuló a cero.

III. 2. 7. 4 Ensayos de campo: LFA

Los ensayos de LFA desarrollados se basaron en un formato de doble reconocimiento, en el que el antígeno diana actúa como reactivo detector y revelador (Figura III.7).

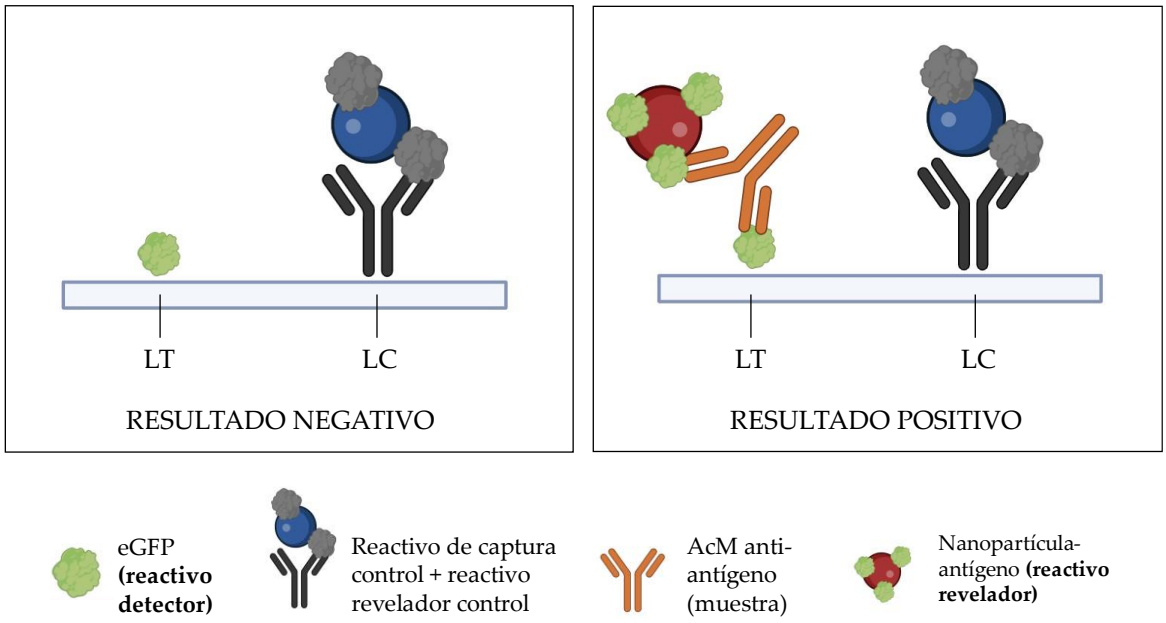


Figura III.7. Esquema de una inmunocromatografía de flujo lateral (LFA) de doble reconocimiento. La membrana de la izquierda muestra un resultado negativo y, la de la derecha, un resultado positivo. Esquema creado con BioRender.com.

III. 2. 7. 4. 1 Preparación de reactivos reveladores

Para la preparación de los reactivos reveladores, las proteínas recombinantes se conjugaron a nanopartículas de látex o a nanopartículas de oro coloidal:

- **Nanopartículas de látex:**

Las nanopartículas de látex se conjugaron covalentemente a las proteínas diana. Para ello, las nanopartículas se lavaron con tampón de lavado de látex y su tamaño y monodispersión se midió mediante dispersión dinámica de luz, usando el equipo Zetasizer Nano S (Malvern). Previo a la conjugación a la proteína, las

nanopartículas se activaron con una mezcla de EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) y NHS (N-hidroxisuccinimida), siguiendo protocolos previamente descritos [154]. A continuación, se añadió la proteína correspondiente en proporción 0,5 o 1 mg/m^2 a las nanopartículas de látex rojo o negro (diámetro: 300 nm, Ikerlat, o 400 nm, Merck, respectivamente) y la mezcla se incubó durante 2 h. Para bloquear los sitios reactivos libres, se añadió 500 mM de imidazol. Finalmente, ambas nanopartículas conjugadas fueron diluidas al 1 % (m/v) en tampón de dilución de nanopartículas. El mismo procedimiento se llevó a cabo con nanopartículas de látex azul (260 nm, Ikerlat) y una proteína control (BSA-biotina).

Por último, las nanopartículas conjugadas se mezclaron utilizando una concentración final de entre 0,05 y 0,15 % (m/v) para las unidas al antígeno específico, y de 0,15 % (m/v) para las conjugadas a la proteína control, en tampón de dilución de reactivos reveladores. La mezcla se dispensó sobre un absorbente de coloide (Entretela 1546, Freudenberg) a 9 μl/cm, utilizando el dispensador Matrix 1600 (Kinematic Automation). Finalmente, los absorbentes se secaron 30 min, a 45 °C.

- **Nanopartículas de oro coloidal:**

Las proteínas recombinantes, así como la proteína control (BSA-biotina), se acoplaron a nanopartículas de oro coloidal (40 nm, Nano Flow). En primer lugar, las nanopartículas se diluyeron a una DO a 530 nm de 1,0 UA en diferentes tampones (confidencial) y se añadió proteína diluida en el mismo tampón a distintas concentraciones. Tras una incubación de 15 min a Ta, se añadió NaCl a una concentración final del 1 % y se midió la DO a 580 nm. En base a la curva de floculación obtenida, se seleccionó la concentración de la proteína, así como el tampón de dilución más adecuado. Posteriormente, se llevó a cabo la reacción de acoplamiento con las condiciones elegidas. Brevemente, la reacción se incubó 1 h a Ta, en agitación. El oro conjugado a la proteína se mezcló con las nanopartículas conjugadas a la proteína control a una DO a 530 nm de 5,0 y 2,5 UA, respectivamente. La mezcla se dispensó sobre el absorbente de coloide (Entretela 1546, Freudenberg) a 9 o 18 μl/cm. Por último, los absorbentes de coloide se secaron a 45 °C durante 30 min.

III. 2. 7. 4. 2 Preparación de los reactivos de captura

Para la preparación de los reactivos de captura, la proteína diana se unió a la línea test de la membrana. Para ello, el antígeno diana se diluyó a una concentración

variable de entre 0,1 y 1,0 mg/ml, en tampón de dilución de reactivo de captura. Por otra parte, el reactivo capturador control (IgG anti-biotina, Operon) se diluyó a 1 mg/ml en el mismo tampón. Las dos disoluciones se dispensaron a 1 µl/cm en líneas paralelas empleando el equipo Matrix 1600 sobre una membrana de nitrocelulosa (HF120, HF135 o HF180, Millipore; CN140, Sartorius) de 25 x 300 mm. Finalmente, la membrana se secó a 45 °C, 5 min.

III. 2. 7. 4. 3 Preparación de las tiras de LFA

El montaje de los ensayos se realizó en láminas de 30 cm sobre un soporte adhesivo como se esquematiza en la Figura III.8. Con el objetivo de favorecer el flujo de la migración de los reactivos, los materiales se colocaron en el siguiente orden: el absorbente de coloide (reactivos reveladores) se colocó solapado 2–3 mm sobre la membrana de nitrocelulosa (reactivos de captura dispuestos en la línea test o la línea control). Solapado y por encima del absorbente de coloide, se situó el absorbente de muestra (Grade 1662 o Grade 1668, Ahlstrom-Munksjö). Este último absorbente se utilizó para retener eritrocitos, ya que, aunque en el presente estudio solo se emplearon muestras de suero, la sangre podría ser una muestra biológica potencial. Por último, se colocó el absorbente final de 25 mm (Grade 237, Ahlstrom-Munksjö) por encima de la membrana. Toda la construcción se recubrió con un adhesivo transparente (Lohmann). La lámina se cortó en tiras de 4,2 mm de ancho con la máquina Matrix 2360 (Kinematic Automation). Finalmente, cada tira se colocó dentro de dispositivos plásticos de doble ventana (Figura III.9).

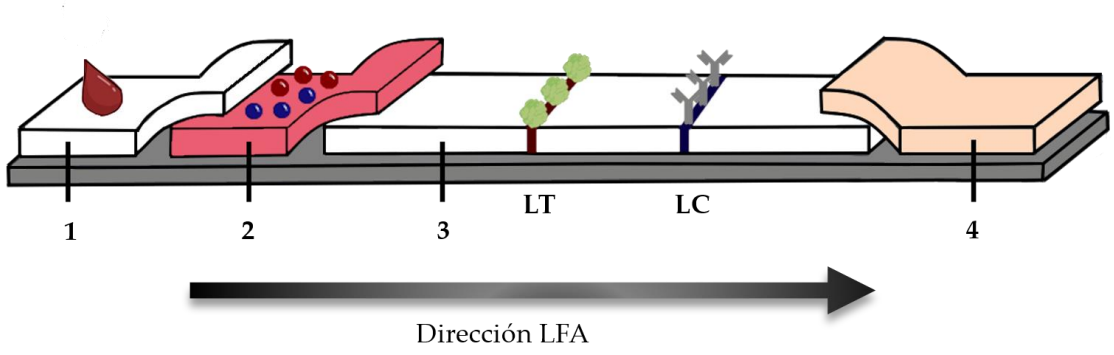


Figura III.8. Componentes de una inmunocromatografía de flujo lateral (LFA). 1- absorbente de muestra, 2- absorbente de coloide (reactivos reveladores), 3- membrana de nitrocelulosa (LT: línea test, LC: línea control), y 4- absorbente final. Creado con BioRender.com.

III. 2. 7. 4. 4 Procedimiento de los ensayos

En el caso de los LFA DIVA desarrollados, se añadieron 10 µl de la muestra de suero en la ventana cuadrada y a continuación, se dispensaron 120 µl de diferentes diluyentes de muestra de LFA en la ventana circular (Figura III.9). Para determinar las mejores condiciones, los resultados se leyeron transcurridos entre 10 y 30 min de incubación a Ta. En el caso del ensayo INgezim® ASFV Combo CROM Ag/Ab, se añadieron 20 µl de la muestra de sangre en la ventana cuadrada correspondiente a cada tira, seguido de 5–6 gotas de diluyente en la ventana cuadrada. Los resultados se leyeron transcurridos 15 min.

Como muestra la Figura III.9, un resultado positivo estuvo indicado por la aparición de dos líneas en la membrana, mientras que, un resultado negativo vino dado por la visualización de únicamente la línea control. Con el objetivo de semicuantificar el resultado, la intensidad de la línea test se midió de 1 a 10, utilizando una escala colorimétrica.

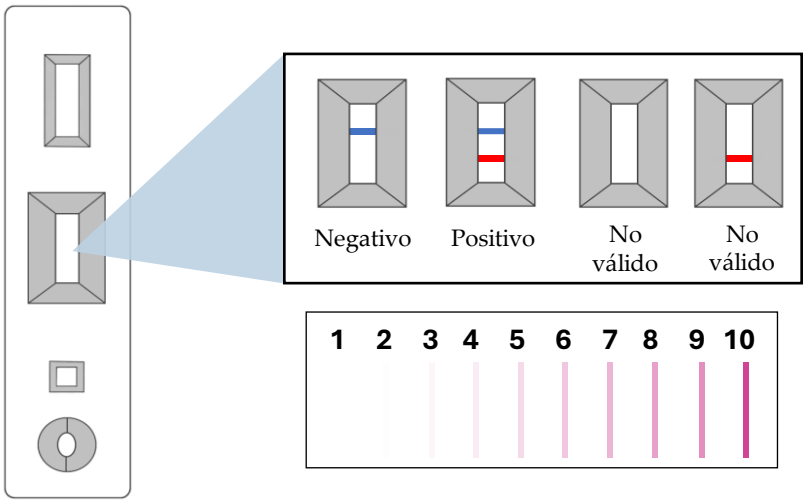


Figura III.9. Interpretación de los resultados obtenidos en el LFA. Línea azul: línea control; línea roja: línea test. La intensidad de la línea test se semicuantifica utilizando la escala colorimétrica que aparece en la figura (positivo ≥ 4).

III. 2. 8 Análisis estadístico

Para comparar las señales obtenidas en ELISA indirecto con dos grupos de muestras, se utilizó la prueba U de Mann-Whitney o la prueba de Wilcoxon. La primera se empleó con muestras independientes (muestras procedentes de distintos animales) mientras que la segunda, se aplicó con muestras pareadas (muestras

procedentes de un mismo animal recogidas a distintos días o diferentes matrices procedentes del mismo animal).

La equivalencia entre las señales obtenidas frente a las dos formas recombinantes de la pEP153R de genotipo II (pEP153R II-TEV-Fc y pEP153R II-Fc) se calculó mediante regresión lineal. La significancia estadística de la regresión se determinó con el test estadístico F. Además, se calculó la concordancia entre ambos ensayos mediante el factor kappa de Cohen.

Por otro lado, para el análisis descriptivo de la distribución de los datos obtenidos en los ELISA indirectos, se utilizó un gráfico de cajas y bigotes.

El cálculo del punto de corte óptimo del ELISA pEP153R y del ELISA eGFP, así como la sensibilidad y especificidad de los ensayos, se determinó mediante un análisis de curva ROC. Cuando el número de muestras positivas o negativas no fue suficientemente alto para realizar este análisis, se empleó una Tabla Diagnóstica 2x2. Para el cálculo de los parámetros diagnósticos, todos los animales vacunados se consideraron negativos en el ELISA pEP153R y todos los infectados, negativos en el ELISA eGFP. Los ensayos comerciales de referencia fueron:

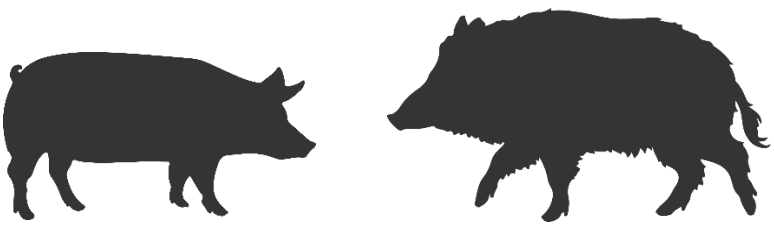
- Para la detección de anticuerpos frente al vPPA (proteínas p72 o p30):
    - INgezim® PPA Compac (GSD Madrid): ELISA de competición para el análisis de muestras de suero.
    - INgezim® ASFV-R (GSD Madrid): ELISA indirecto para el análisis de muestras alternativas (sangres y tejidos).
- Para la detección de anticuerpos frente al vPPC (proteína E2):
    - INgezim® CSF Compac (GSD Madrid): ELISA de competición para el análisis de muestras de suero.

Por otro lado, en el desarrollo del ensayo múltiple y del LFA, los ELISA indirectos desarrollados para la detección de anticuerpos frente a los antígenos pEP153R de genotipo II, eGFP o pEP153R de genotipo I se consideraron como ensayos de referencia.

La comparativa entre dos proporciones se realizó utilizando el test χ^2 (N−1).

Todos los análisis estadísticos se calcularon con un intervalo de confianza (IC) del 95 % y se realizaron en el programa MedCalc® (versión 10.1.7.0).

CAPÍTULO IV RESULTADOS



Con el fin de facilitar la lectura, el capítulo de resultados se presenta dividido en cuatro apartados diferentes, relacionados con los tres objetivos del presente trabajo de tesis doctoral:

- **IV.1. Producción y caracterización de los reactivos clave para el desarrollo de los inmunoensayos**: los resultados presentados en esta sección engloban el objetivo 1.

- **IV.2. Diseño y desarrollo de un ELISA DIVA**: los resultados de esta sección abarcan parte del objetivo 2 y del objetivo 3.

- **IV.3. Diseño y puesta a punto de un ensayo múltiple DIVA: ELISA-*microarray***: los resultados expuestos en este apartado responden a parte del objetivo 2.

- **IV.4. Desarrollo de ensayos rápidos de campo**: los resultados presentados en esta sección engloban parcialmente el objetivo 2 y el objetivo 3.

IV. 1. PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS REACTIVOS CLAVE PARA EL DESARROLLO DE LOS INMUNOENSAYOS

En este Capítulo se describe la producción y caracterización de proteínas recombinantes y AcM, considerados reactivos clave en los inmunoensayos de diagnóstico desarrollados en esta tesis doctoral. Concretamente, se describe la clonación de los genes codificantes, y la expresión y purificación de las proteínas recombinantes 9GL, pEP153R, CD2v, eGFP y mCherry, así como el estudio de su capacidad antigénica. En el caso de las proteínas pEP153R y CD2v, dado que sus secuencias varían entre genotipos y considerando el elevado número de genotipos del vPPA descritos, se llevó a cabo adicionalmente un análisis comparativo de sus secuencias de aminoácidos. Por último, se detalla la producción y caracterización de los AcM obtenidos frente a la proteína eGFP.

IV. 1. 1 Proteína 9GL

IV. 1. 1. 1 Producción de la proteína 9GL

La expresión de la proteína 9GL se llevó a cabo en el **sistema de *E. coli* y en células de insecto**. En primer lugar, la secuencia del gen sintético B119L del aislado Lv17/WB/Rie1, optimizada para su expresión en el sistema de *E. coli*, se amplificó usando los oligonucleótidos 1_D y 2_R. Este gen se clonó en los vectores de expresión pDEST™17, pDEST™15 y pAcHLTA/GW mediante el sistema Gateway™. El primer y tercer vector agregaron al gen de interés la secuencia correspondiente a la etiqueta 6xHis, mientras que el segundo, incorporó la de la etiqueta GST. Como resultado final del proceso de clonación, se obtuvieron los plásmidos recombinantes pDEST™17/B119L, pDEST™15/B119L y pAcHLTA/GW/B119L (Tabla III.7).

Los plásmidos pDEST™17/B119L y pDEST™15/B119L se utilizaron para transformar **células competentes de *E. coli*** BL21 (DE3). Seguidamente, para comprobar la expresión de la proteína de interés y seleccionar el clon con la mayor producción, se realizó una **cinética de expresión a 37 °C**. Como muestra la Figura IV.1.a, se evaluaron los perfiles proteicos de los extractos celulares totales a distintos tiempos posinducción, mediante SDS-PAGE al 15 % seguido de una tinción con Coomassie. En ambas expresiones, se visualizó una banda cercana a la masa molecular teórica predicha para cada proteína recombinante (His-9GL: 17,5 kDa;

GST-9GL: 42,5 kDa), presentando un aumento progresivo a lo largo del tiempo. La identificación de la banda correspondiente a la proteína de interés se realizó mediante *western blot*, utilizando un AcM anti-His o anti-GST, según la etiqueta de cada caso (Figura IV.1.b). A continuación, se realizó una expresión a **baja temperatura** (25 °C o 18 °C), para favorecer la solubilidad de la proteína. Sin embargo, tras el fraccionamiento de las células, la mayor parte de la proteína se detectó en la FI del extracto celular en todos los casos (datos no mostrados).

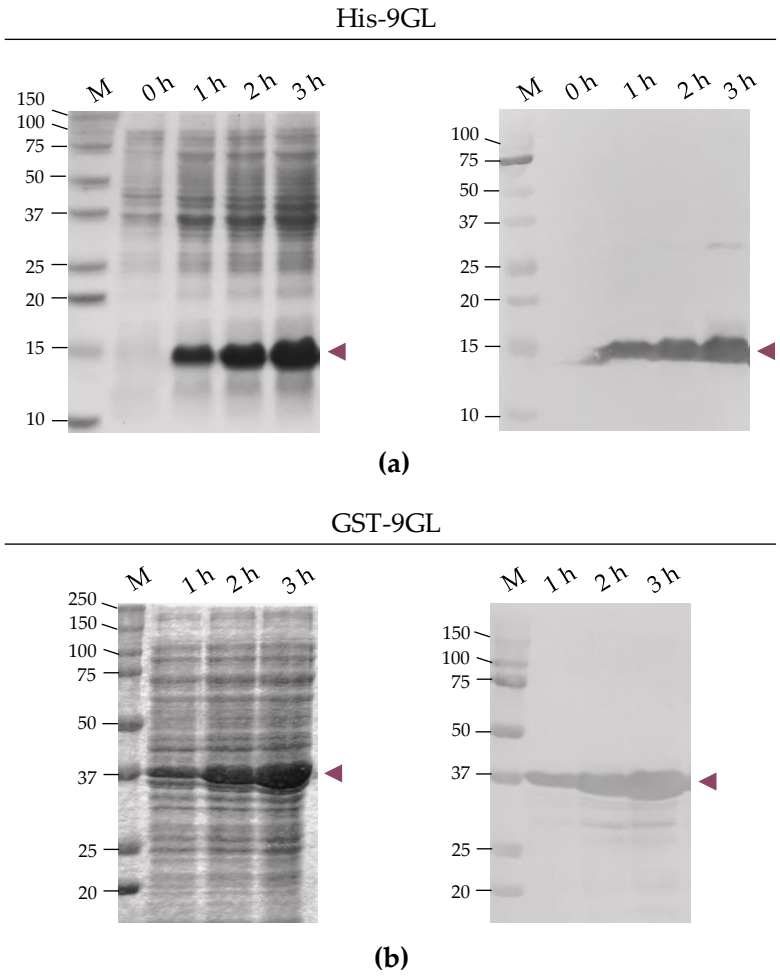


Figura IV.1. Cinética de expresión a 37 °C de las dos versiones de la proteína 9GL expresadas en *E. coli*. (a) His-9GL; **(b)** GST-9GL. En cada caso, el panel de la izquierda muestra el análisis mediante SDS-PAGE-tinción con Coomassie y el de la derecha, mediante *western blot* usando un AcM anti-His o anti-GST para cada tiempo posinducción (0–3 h). Las flechas indican la altura de la banda correspondiente a la proteína de interés. Las masas moleculares del marcador (M) se indican en kDa.

Posteriormente, las dos versiones recombinantes de la proteína (His-9GL y GST-9GL) se solubilizaron a partir de los cuerpos de inclusión, utilizando una

concentración del 2,5 % (v/v) de **sarcosilo**. Los distintos pasos del proceso se evaluaron mediante SDS-PAGE al 15 % y posterior tinción con Coomassie o *western blot*. Como se observa en las Figura IV.2.a y c, se consiguió solubilizar la mayor parte de ambas proteínas de interés, siendo mayoritaria la banda correspondiente a cada una de ellas. A continuación, las proteínas se purificaron mediante IMAC o glutatión, según su etiqueta. Sin embargo, a pesar de la optimización del protocolo, no fue posible la unión de ninguna de las proteínas a las resinas de afinidad.

Tras este resultado, se probó un método de solubilización diferente. De este modo, la FI celular obtenida en la expresión de la proteína His-9GL (*E. coli*) se solubilizó con **cloruro de guanidinio**. A continuación, la proteína se purificó por IMAC, obteniéndose un alto nivel de pureza, como se observa en la Figura IV.2.b.

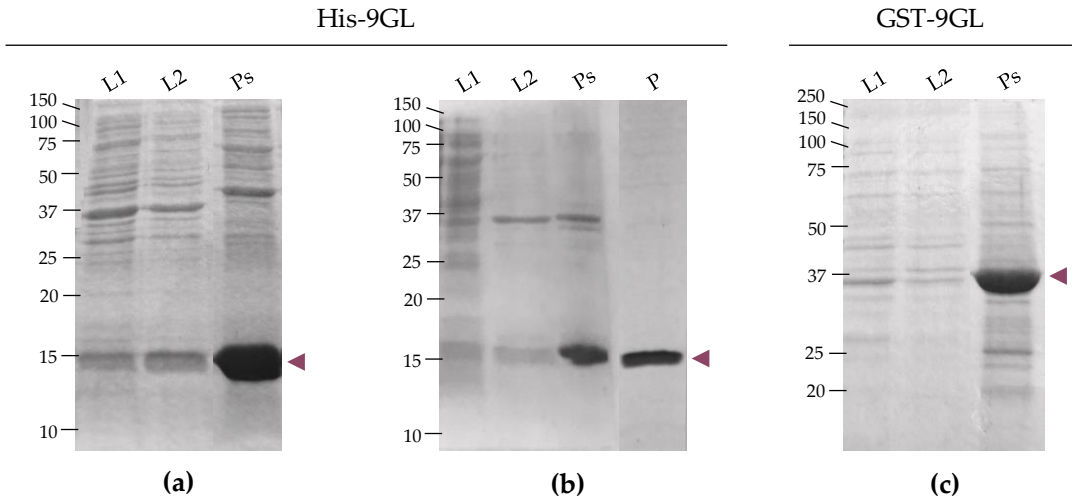


Figura IV.2. Análisis de la solubilización y purificación de la proteína 9GL expresada en *E. coli*, mediante SDS-PAGE-tinción con Coomassie. (a) His-9GL solubilizada con sarcosilo; **(b)** His-9GL solubilizada con cloruro de guanidinio y purificada mediante IMAC; **(c)** GST-9GL solubilizada con sarcosilo. L1, L2: lavados; Ps: proteína solubilizada; P: proteína purificada. Las flechas indican la altura de la banda correspondiente a la proteína de interés. Las masas moleculares del marcador se indican en kDa.

En paralelo, se llevó a cabo la expresión en **células de insecto**. El plásmido pAcHLTA/GW/B119L se utilizó para la obtención del baculovirus recombinante AcHLTA/B119L (Tabla III.2), siguiendo el procedimiento descrito en el apartado de M&M III. 2. 3. 2. Brevemente, se seleccionaron 5 clones de baculovirus recombinantes, que se emplearon para infectar células Sf9. Tras la recogida de los cultivos, estos se fraccionaron para obtener la FS y la FI. A continuación, los perfiles proteicos de ambas fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE al 15 %, seguido

de tinción con Coomassie o *western blot*. En la Figura IV.3, se muestra el análisis de las expresiones de la proteína His-9GL (Sf9), correspondientes a las infecciones con 3 clones de baculovirus diferentes. En la FI de las expresiones con todos los clones, se observó una banda con una masa molecular aproximada a la predicha teóricamente para la proteína (20 kDa). Dicha banda no se detectó en las fracciones de las células sin infectar (control negativo). Al no observarse diferencias entre las expresiones con los distintos clones, se seleccionó aleatoriamente el clon AcHLTA/B119L #1 para la obtención de un inóculo de alto título viral ($2{,}7 \cdot 10^8$ ufp/ml).

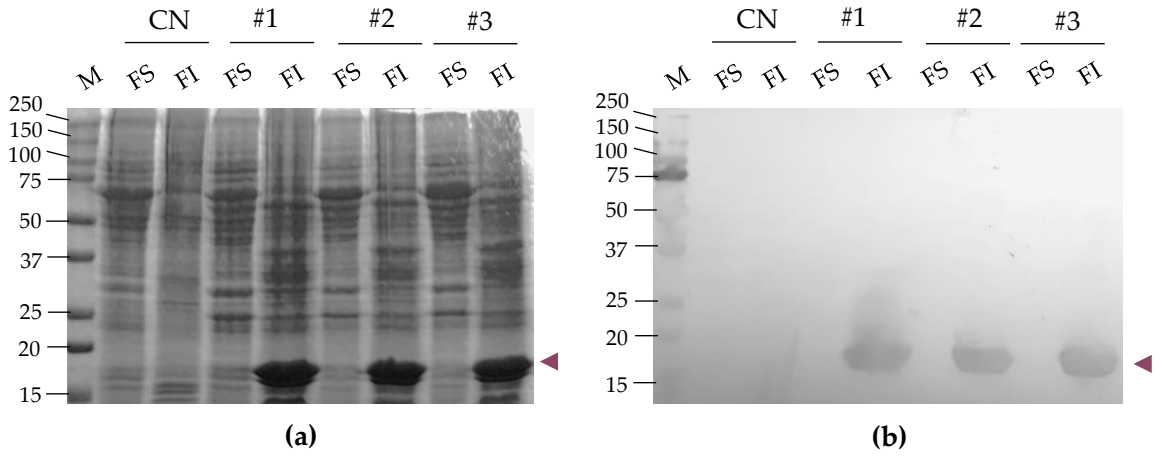


Figura IV.3. Análisis de la expresión de la proteína His-9GL (Sf9) mediante SDS-PAGE. **(a)** Tinción con Coomassie; **(b)** *western blot*, usando un AcM anti-His. #1, #2 y #3: clones del baculovirus recombinante AcHLTA/B119L; CN: células no infectadas; FS: fracción soluble; FI: fracción insoluble. Las flechas indican la altura de la banda correspondiente a la proteína de interés. Las masas moleculares del marcador (M) se indican en kDa.

Posteriormente, se expresó la proteína 9GL utilizando distintas mdi y días de recogida. Tras la recogida y fraccionamiento de los cultivos, se analizaron los perfiles proteicos de las fracciones celulares obtenidas, detectándose la proteína de interés solamente en la FI de todas las expresiones. La mayor cantidad de His-9GL (Sf9) se obtuvo al tercer dpi, y mdi de 1,0. A continuación, se solubilizó la FI con sarcosilo al 2,5 % (v/v) y los distintos pasos del proceso se evaluaron mediante SDS-PAGE al 15 % y posterior tinción con Coomassie y *western blot*, usando un AcM anti-His (datos no mostrados). Con este método de solubilización se consiguió un rendimiento elevado; sin embargo, no fue posible la purificación posterior de la proteína mediante IMAC.

Las distintas versiones de la proteína 9GL se cuantificaron mediante densitometría en SDS-PAGE y tinción con Coomassie, usando una curva patrón de concentraciones de BSA conocidas. Adicionalmente, se determinó la cantidad de proteína total por el método BCA para determinar su nivel de pureza. Como resumen, en la Tabla IV.1, se muestran los resultados obtenidos de concentración, pureza y rendimiento de cada una de las versiones recombinantes de la proteína 9GL.

Tabla IV.1. Parámetros obtenidos en la expresión y solubilización/purificación de las versiones recombinantes de la proteína 9GL.

Versión recombinante de la proteína 9GL	Protocolo de solubilización	Grado de Pureza (%)	Concentración 9GL (mg/ml)	Rendimiento (mg/100 ml cultivo)
His-9GL (*E. coli*)	Sarcosilo	80	1,3	6,8
	Cloruro de guanidinio	> 95	0,5	3,2
GST-9GL	Sarcosilo	80	1,1	19
His-9GL (Sf9)	Sarcosilo	65	1,2	7,5

IV. 1. 1. 2 Análisis de la antigenicidad de la proteína 9GL

La antigenicidad de las distintas versiones recombinantes de la proteína 9GL se analizó mediante ELISA indirecto y *western blot*. Para ello, se utilizaron sueros experimentales negativos (0 dpi/dpv) y positivos (≥ 21 dpi/dpv) procedentes de cerdos infectados o vacunados experimentalmente con aislados del vPPA (Grupo A1 y A2, respectivamente, Tabla III.11) y sueros negativos de campo. Todas las muestras habían sido caracterizadas previamente en el INgezim® PPA Compac.

Respecto al **ELISA indirecto**, se optimizaron los parámetros del ensayo, tales como la concentración del antígeno tapizado, el tipo de diluyente de muestra, los tiempos y temperaturas de incubación, etc. Tras la optimización del ELISA con cada una de las versiones de la proteína, se obtuvieron resultados similares frente a todas ellas. A modo de ejemplo, las Figura IV.4.a y b muestran los resultados obtenidos, utilizando como antígeno la proteína His-9GL (*E. coli*) solubilizada con cloruro de guanidinio o la proteína His-9GL (Sf9), respectivamente. La primera versión de la proteína se tapizó a 2 ng/µl y la segunda, a 10 ng/µl. En ambos casos, se utilizó un AcM anti-IgG de cerdo, 1BH7-PO, como anticuerpo secundario, diluido en solución de bloqueo con 0,5 M NaCl, y la reacción de revelado se mantuvo durante 30 min. No obstante, no se detectó señal diferencial entre los sueros experimentales negativos y positivos frente a ninguna de las versiones recombinantes de la 9GL.

Mientras que, sí se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa entre la señal obtenida con las muestras experimentales positivas y las negativas de campo. Por otro lado, en el ensayo se detectaron señales inespecíficas frente a los antígenos negativos, siendo inferiores a las observadas frente a la proteína 9GL (datos no mostrados).

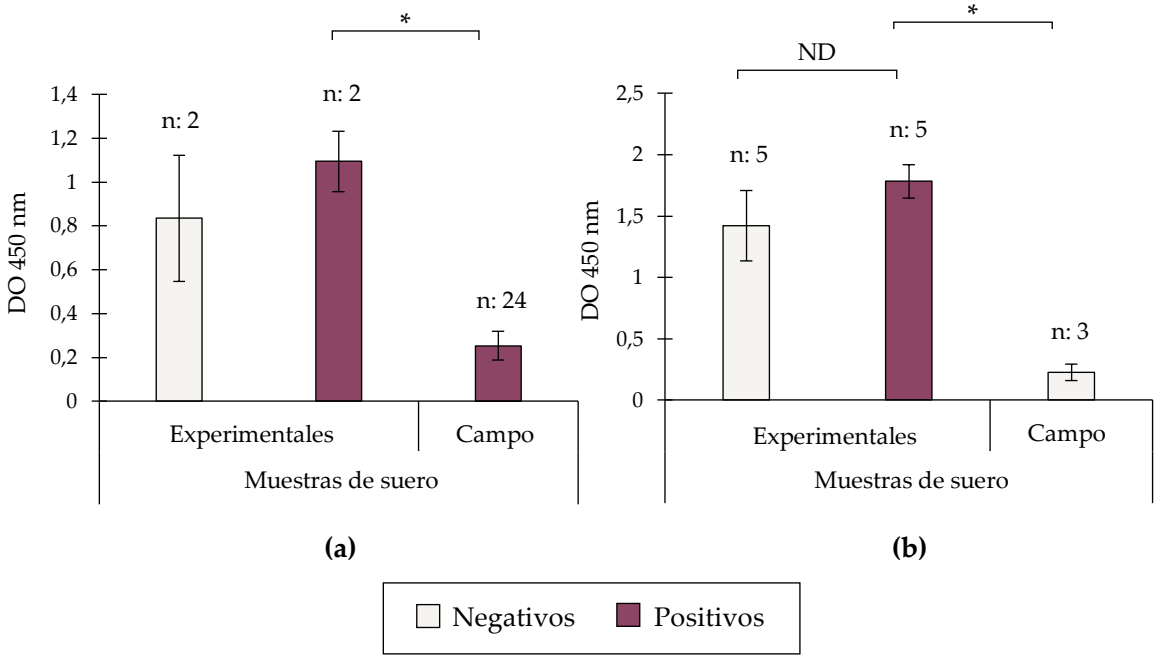


Figura IV.4. Análisis de la antigenicidad de las versiones recombinantes de la proteína 9GL mediante ELISA indirecto. (a) His-9GL (*E. coli*) solubilizada con cloruro de guanidinio; **(b)** His-9GL (Sf9). El eje de ordenadas muestra la densidad óptica (DO) a 450 nm y el eje de abscisas, los sueros. La barra representa la DO media de las muestras analizadas ± desviación estándar; n: número de muestras; valor de significancia estadística: prueba U de Mann-Whitney o prueba de Wilcoxon (*: $p < 0.05$, ND: sin diferencias).

En paralelo, se evaluó la antigenicidad de la proteína 9GL en ***western blot***. Brevemente, se utilizaron 2 μg de las distintas versiones recombinantes de la proteína de interés, así como de antígenos negativos no relacionados, expresados y purificados de la misma forma que cada una de las proteínas diana. Como anticuerpo revelador se utilizó el AcM anti-IgG de cerdo 1BH7-PO. Los resultados obtenidos fueron consistentes con los observados en el ELISA, ya que se detectaron múltiples bandas en las membranas incubadas con los sueros negativos experimentales, sin observarse un reconocimiento específico frente a la proteína 9GL (datos no mostrados).

En conjunto, los resultados indicaron que ninguna de las versiones recombinantes de la proteína 9GL, permitía detectar una respuesta serológica

específica frente a esta. De forma paralela, los estudios *in vivo* con candidatos vacunales que contenían el gen B119L como marcador negativo, tampoco fueron prometedores [155]. Por tanto, se descartó el uso de esta proteína en el desarrollo de los inmunoensayos DIVA.

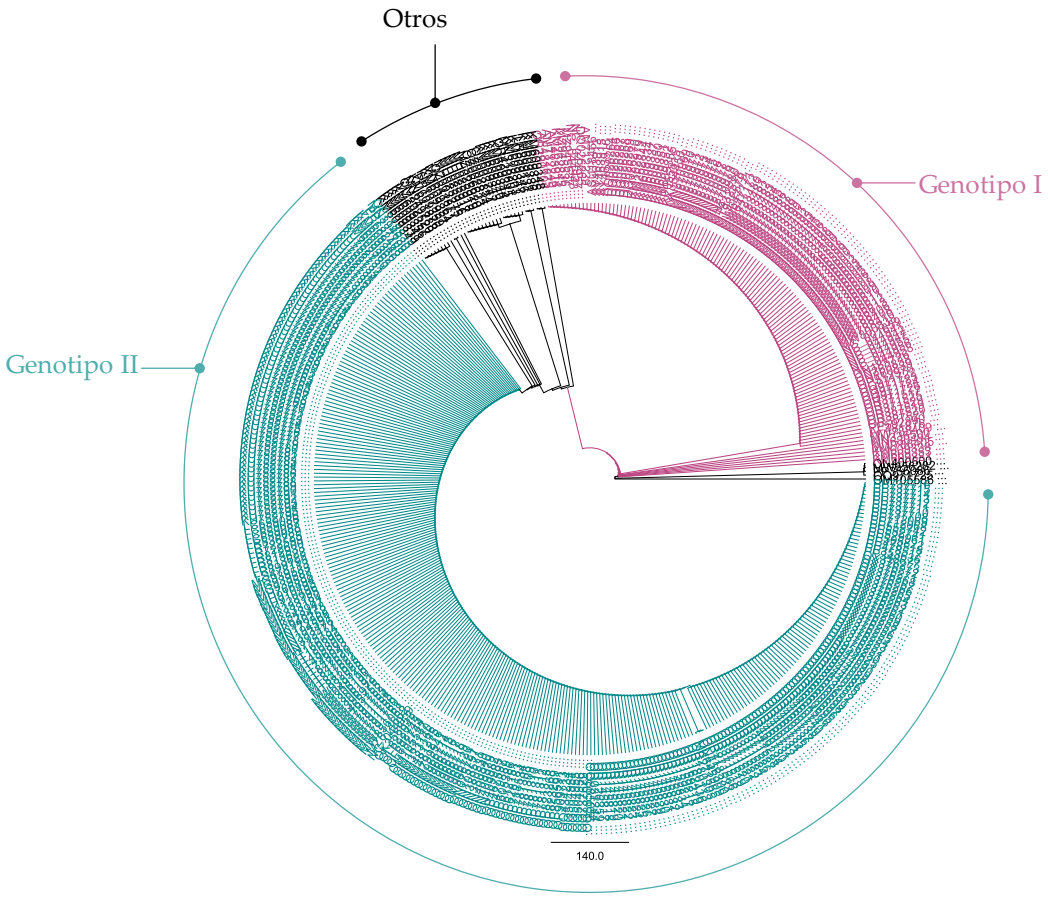
IV. 1. 2 Proteína EP153R

IV. 1. 2. 1 Análisis de las secuencias de la pEP153R

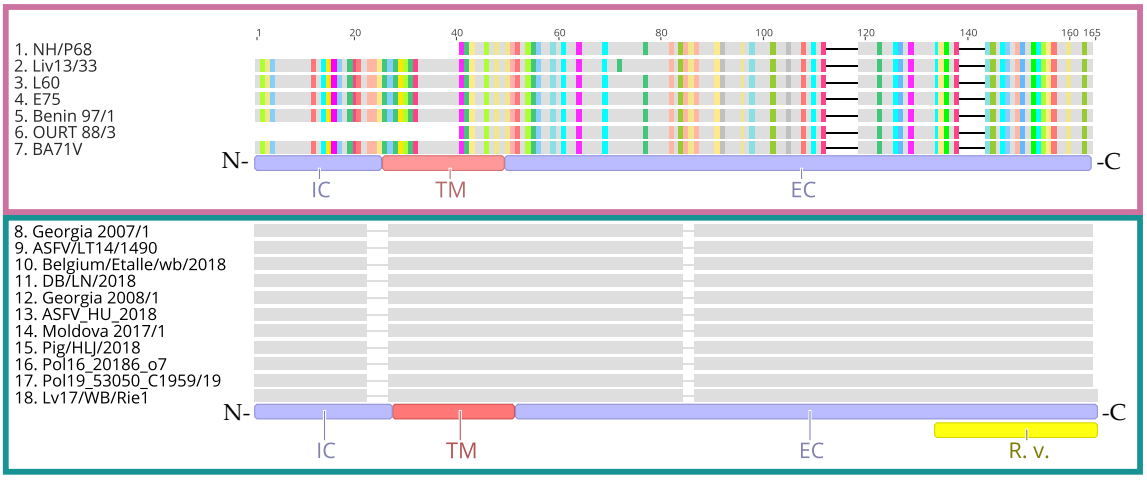
En primer lugar, se llevó a cabo un análisis exhaustivo de las secuencias de aminoácidos de la pEP153R, disponibles en la base de datos del NCBI, según se describe en el apartado de M&M III. 2. 5. 3. El alineamiento múltiple, seguido de la construcción de un árbol filogenético, mostró la agrupación de todas las secuencias de la pEP153R de genotipo II en el mismo clado (Figura IV.5.a). Dentro del clado, todas las secuencias mostraron un porcentaje de identidad mayor del 99 %, a excepción de 1 secuencia procedente de un virus aislado en una muestra de Ghana (OP718533). Por otro lado, las secuencias correspondientes a los virus de genotipo I, mostraron mayor variabilidad. En concreto, se identificó una versión más corta de la proteína en los aislados NH/P68 y OURT 88/3, faltando los primeros 40 aminoácidos del extremo amino-terminal (Figura IV.5.b). Además, se identificó una región en el dominio extracelular de la proteína, en la que se concentraba una gran variabilidad entre las secuencias proteicas correspondientes a aislados de los genotipos I y II.

Para la expresión heteróloga de la proteína, se seleccionó el dominio extracelular. La secuencia correspondiente a esta región se anotó en los aislados con los que se iba a trabajar: BA71V (genotipo I) y Lv17/WB/Rie1 (genotipo II), en base a su perfil hidrofóbico. El resultado de la anotación se muestra en la Figura IV.5.b.

Asimismo, se predijeron los sitios potenciales de glicosilación para el dominio extracelular de las proteínas correspondientes a los aislados seleccionados. Esta predicción reveló 5 sitios potenciales de N-glicosilaciones para la pEP153R del aislado Lv17/WB/Rie1 y 6, para la pEP153R del vPPA BA71V.



(a)



(b)

Figura IV.5. Análisis de las secuencias de aminoácidos de la pEP153R. (a) Árbol filogenético de las secuencias proteicas; **(b)** alineamiento múltiple de algunas secuencias representativas del genotipo I (rectángulo rosa) y del genotipo II (rectángulo azul). Los residuos aminoacídicos diferentes a la secuencia de referencia, Lv17/WB/Rie1, se muestran coloreados (cada color representa un aminoácido diferente). N-: extremo amino-terminal; IC: dominio intracelular; TM: dominio transmembrana; EC: dominio extracelular; C-: extremo carboxilo-terminal; R. v.: región variable del EC.

IV. 1. 2. 2 Proteína EP153R de genotipo II

IV. 1. 2. 2. 1 Producción de la pEP153R de genotipo II

La secuencia codificante del dominio extracelular de la pEP153R del aislado Lv17/WB/Rie1 se amplificó a partir del gen sintético EP153R.II.1, usando los oligonucleótidos 3_D y 4_R. Posteriormente, el producto de la PCR se clonó en el plásmido pCMV6-AC-FC-S, empleando las enzimas de restricción AscI y XhoI. Este vector permitió la fusión de la proteína a la etiqueta Fc de ratón en el extremo carboxilo-terminal, así como al péptido señal de la interleucina-2, en el amino-terminal. Este péptido señal facilita la secreción extracelular de la proteína de interés en células de mamífero. El plásmido recombinante resultante fue el pCMV6-AC-FC-S/EP153R.II/1 (Tabla III.7).

Posteriormente, se transfectaron células de mamífero HEK-293-F con el plásmido recombinante purificado, y se evaluó la **cinética de la expresión** de la proteína pEP153R II-TEV-Fc. Para ello, el cultivo se recogió y fraccionó (SB, FS y FI) a los 3, 4, 5, 6 y 7 dpt. Las fracciones obtenidas se analizaron mediante SDS-PAGE al 12 %, seguido de tinción con Coomassie, sin observarse una banda correspondiente a la masa molecular esperada para la proteína en ninguna de las tres fracciones del cultivo celular. Sin embargo, el análisis por *western blot*, empleando un AcM anti-Fc de ratón-PO, reveló la presencia de una banda en las tres fracciones del cultivo. En la fracción del SB, se detectó una banda de mayor tamaño en comparación a la observada en la FS y la FI. En la Figura IV.6 se muestran los resultados correspondientes a los 6 dpt, día al que se detectó la señal de máxima intensidad en la fracción del SB.

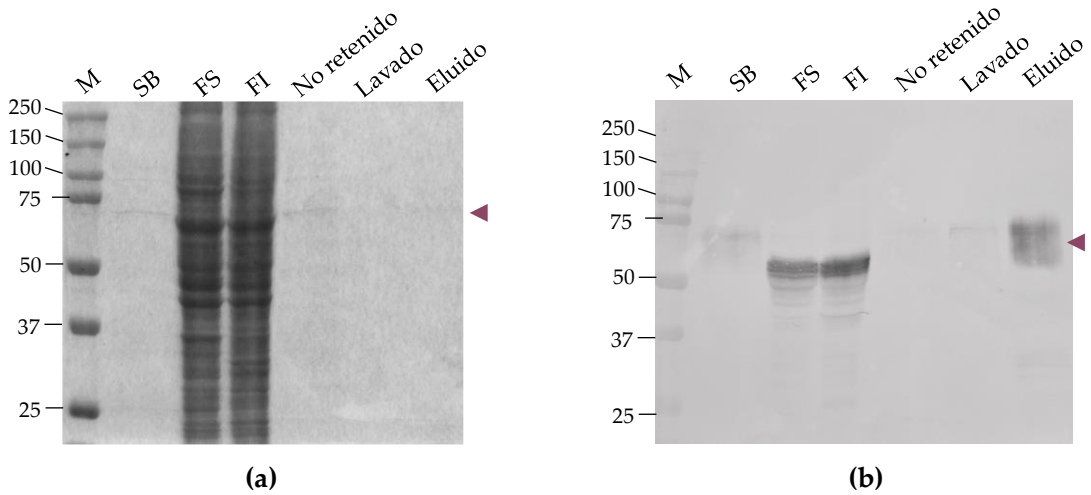


Figura IV.6. Análisis de la expresión y purificación de la pEP153R II-TEV-Fc a día 6 postransfección. SDS-PAGE seguido de: **(a)** tinción con Coomassie; **(b)** *western blot*, utilizando un AcM anti-Fc de ratón-PO. SB: sobrenadante del cultivo celular, FS: fracción soluble, FI: fracción insoluble. Las flechas indican la banda correspondiente a la proteína de interés. Las masas moleculares del marcador (M) se expresan en kDa.

Posteriormente, se realizó un cultivo de mayor volumen (500 ml) que se recogió a los 6 dpt y, a partir del SB, la proteína se purificó mediante cromatografía de afinidad, utilizando una resina de proteína G. Como se observa en la Figura IV.6.b, la identidad de la proteína purificada se confirmó mediante *western blot*, usando un AcM anti-Fc de ratón-PO, aunque no se visualizó en la tinción con Coomassie debido a que presentaba una concentración muy baja (Figura IV.6.a). La cuantificación de la proteína se realizó mediante densitometría de SDS-PAGE-tinción de plata, usando una curva patrón de BSA (Figura IV.7).

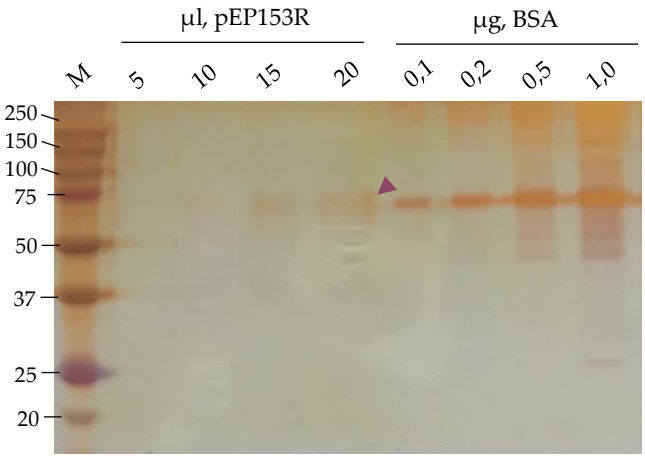


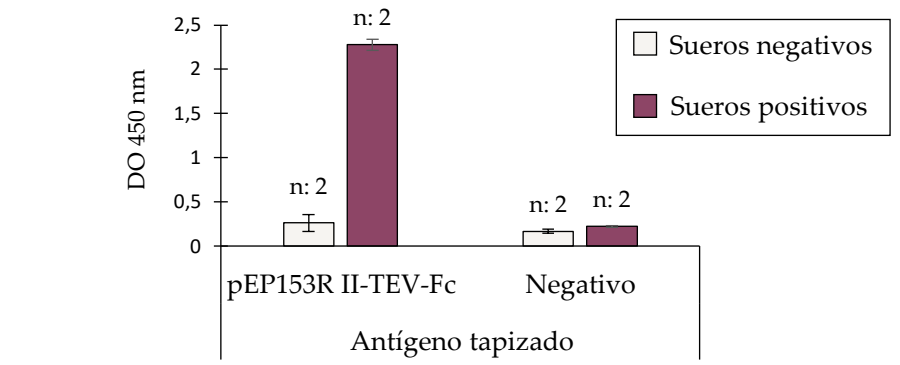
Figura IV.7. Cuantificación de la pEP153R II-TEV-Fc. Densitometría de SDS-PAGE-tinción de plata. Carriles 1-4: cuatro volúmenes de la proteína diana; carriles 5-9: curva patrón de BSA. La flecha indica la banda correspondiente a la proteína de interés. Las masas moleculares del marcador (M) se expresan en kDa.

Así, se determinó que la proteína purificada tenía una concentración de 15 ng/µl y una pureza cercana al 100 %. El rendimiento de la expresión fue de 45 µg en 100 ml de cultivo.

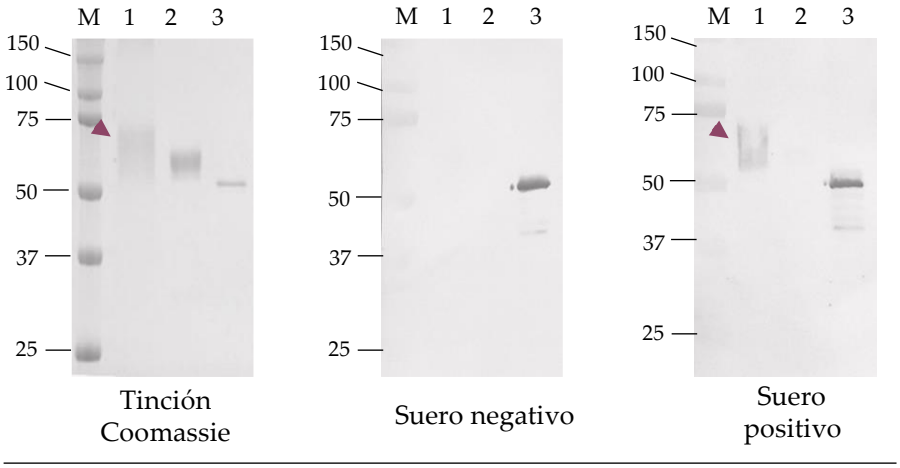
IV. 1. 2. 2. 2 Análisis de la antigenicidad de la pEP153R de genotipo II

El análisis de la antigenicidad de la proteína se realizó mediante ELISA indirecto y *western blot*. En el primer caso, la pEP153R II-TEV-Fc, así como una proteína no relacionada, expresada y purificada en las mismas condiciones que la proteína de interés, se utilizaron como antígenos en el **ELISA indirecto**. El ensayo se optimizó utilizando dos sueros negativos (0 dpi) y dos positivos (21-, 29 dpi), previamente caracterizados en el ensayo INgezim® PPA Compac. Estas muestras eran procedentes de dos cerdos infectados experimentalmente con aislados del vPPA de genotipo II, Es16/WB-Viru8 o Lv17/WB/Rie1 (Grupo A1 y C, respectivamente, Tabla III.11). Para este estudio inicial de la antigenicidad, se seleccionaron como condiciones del ensayo una concentración de proteína para el tapizado de las placas de 0,4 ng/µl y se utilizó el AcM anti-IgG de cerdo 1BH7-PO como conjugado. Como se muestra en la Figura IV.8.a, se detectó una señal diferencial entre los sueros negativos y positivos analizados frente al antígeno pEP153R de genotipo II, mientras que no se detectó señal frente al antígeno negativo con ninguna de las muestras analizadas.

En cuanto al análisis mediante ***western blot***, se analizó la señal de un suero negativo (0 dpi) y otro positivo (42 dpi) (Grupo A1, Tabla III.11), previamente caracterizados en el INgezim® PPA Compac y procedentes de un cerdo doméstico infectado experimentalmente con Lv17/WB/Rie1. Para ello, se utilizaron 500 ng de cada una de las proteínas: pEP153R II-TEV-Fc y un antígeno negativo. Además, se empleó proteína A/G como control positivo de la técnica y como anticuerpo secundario, el AcM anti-IgG de cerdo 1BH7-PO. Como muestra la Figura IV.8.b, se detectó una banda correspondiente al tamaño esperado para la proteína cuando la membrana se incubó con el suero positivo, mientras que no se detectó ninguna señal al incubarla con la muestra negativa. Además, ninguno de los sueros reveló señal frente al antígeno negativo.



(a)



(b)

Figura IV.8. Análisis de la antigenicidad de la pEP153R de genotipo II. (a) ELISA indirecto. El eje de ordenadas muestra la densidad óptica (DO) a 450 nm obtenida en el ensayo y el eje de abscisas, el antígeno tapizado. Las barras indican la DO media de las muestras analizadas ± la desviación estándar; n: número de muestras; **(b)** SDS-PAGE-tinción con Coomassie o *western blot* (sueros de cerdos, revelados con un AcM anti-IgG de cerdo-PO, 1BH7-PO): 1- pEP153R de genotipo II, 2- antígeno negativo, 3- proteína A/G. La flecha señala la banda correspondiente a la proteína de interés. En los análisis se usaron sueros experimentales negativos (0 dpi) y positivos (≥ 21 dpi).

Adicionalmente, se analizó la **cinética de seroconversión** frente a la pEP153R de genotipo II en animales infectados con diferentes aislados de genotipo II. Además, debido a las diferencias detectadas entre las secuencias (Figura IV.5), se estudió si el antígeno era reconocido por los anticuerpos generados en una infección con aislados de genotipo I y XXIII. Para ello, se analizaron 170 sueros procedentes de cerdos domésticos infectados experimentalmente con diferentes aislados del

vPPA (Tabla IV.2). La seroconversión frente a la proteína p72 del vPPA había sido confirmada mediante el ensayo INgezim® PPA Compac, en todos los animales incluidos en el análisis.

Tabla IV.2. Muestras de sueros analizadas para la determinación de la antigenicidad de la pEP153R de genotipo II.

vPPA	Genotipo	No. animales	No. de muestras	Grupo[2]
Lv17/WB/Rie1	II	6	42	A1
Es16/WB-Viru8	II	1	15	C
Pol18/WB/Case1794	II	2	49	C
Lv17/WB/Rie14/Tukuma5	II	1	23	C
NH/P68	I	2	20	D
ET13/1504	XXIII	2	21	E

[2]Grupo de la Tabla III.11.

Como muestra la Figura IV.9.a, en 7 de los 10 animales infectados con aislados de genotipo II, la señal de DO aumentó a partir de diferentes tiempos, a partir de los 21 dpi. Este resultado indicó la seroconversión de estos animales frente a la pEP153R de genotipo II. En los 3 animales en los que no se detectó seroconversión frente a la proteína, se analizaron muestras recogidas hasta los 20 dpi. La aparición de anticuerpos frente a este antígeno mostró un retraso de 2 semanas de media, respecto a la seroconversión frente a la proteína control, p72. Para uno de los animales infectados con un aislado de genotipo II (Lv17/WB/Rie14/Tukuma5), se incluyeron muestras recogidas hasta los 111 dpi. El nivel de anticuerpos se mantuvo hasta la última muestra analizada, correspondiente a los 90 días tras la seroconversión. Por el contrario, en los animales infectados con el aislado NH/P68 o ET13/1504, Figura IV.9.b y c, respectivamente, no se detectaron anticuerpos específicos frente a la proteína.

Por tanto, estos resultados mostraron que la versión recombinante expresada de la pEP153R de genotipo II, pEP153R-TEV-Fc, era antigénica frente a muestras de sueros procedentes de animales infectados con aislados del vPPA de genotipo II.

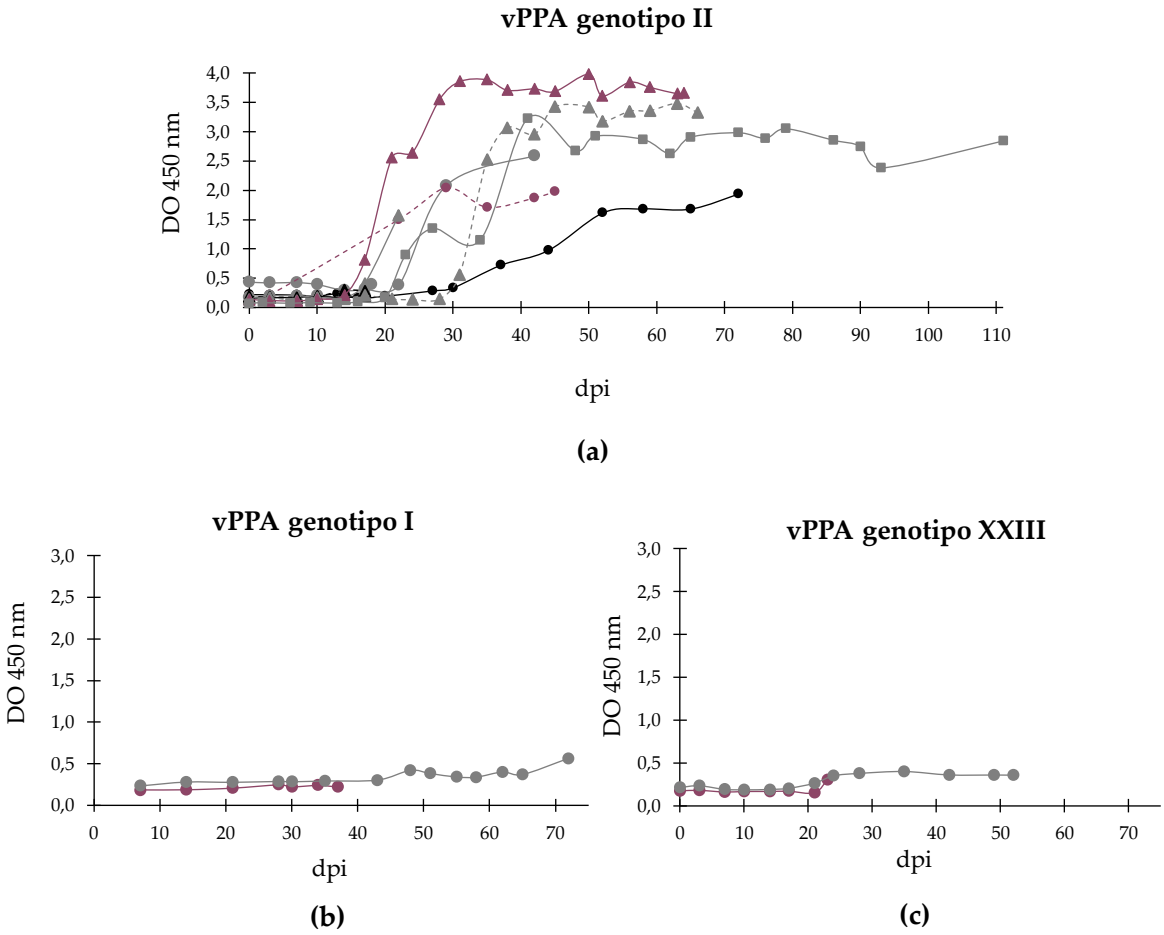


Figura IV.9. Análisis de la antigenicidad de la pEP153R de genotipo II. ELISA indirecto usando sueros de cerdos domésticos infectados experimentalmente con aislados del vPPA de: **(a)** genotipo II; **(b)** genotipo I; **(c)** genotipo XXIII. En cada gráfica, el eje de ordenadas muestra la densidad óptica (DO) a 450 nm obtenida en el ELISA y el eje de abscisas, los días posinfección (dpi). Cada línea representa un animal diferente.

IV. 1. 2. 2. 3 Mejora del rendimiento de la proteína pEP153R genotipo II

Puesto que el rendimiento de la producción de la pEP153R II-TEV-Fc fue muy bajo (45 µg/100 ml de cultivo), se siguieron diferentes estrategias para su mejora a dos niveles diferentes. En primer lugar, se hicieron cambios en el proceso de purificación y a continuación, se trabajó a nivel de la secuencia génica expresada:

- **Mejora 1.** Purificación mediante cromatografía de afinidad a Proteína A:

Partiendo del SB recogido a 6 dpt, se realizaron en paralelo dos purificaciones mediante cromatografía de afinidad a Proteína A o Proteína G. Seguidamente, se analizaron los distintos pasos de la purificación mediante SDS-PAGE al 12 %,

seguido de una tinción con Coomassie y *western blot*, usando un AcM anti-Fc de ratón-PO. Estos análisis no revelaron diferencias aparentes entre los dos tipos de purificación. Posteriormente, las proteínas purificadas mediante ambos métodos se tapizaron por dilución para comprobar su comportamiento en ELISA indirecto, realizando el ensayo en las mismas condiciones para ambos antígenos. Las muestras analizadas fueron un suero negativo (0 dpi) y un suero positivo (58 dpi) de un cerdo doméstico infectado experimentalmente con el aislado Es16/WB-Viru8 (Grupo C, Tabla III.11), previamente caracterizadas en el ensayo INgezim® PPA Compac. Así, no se observaron diferencias significativas entre las señales diferenciales obtenidas con los dos sueros analizados frente a la proteína purificada con Proteína A o Proteína G (datos no mostrados). Por tanto, dado que la purificación con Proteína A no mejoró ni el rendimiento ni la señal obtenida en el ELISA, se decidió descartar su uso.

- **Mejora 2.** Purificación a partir de la fracción soluble:

La proteína presente en la FS recogida a 6 dpt se purificó mediante cromatografía de afinidad a Proteína G. La purificación se analizó mediante SDS-PAGE al 12 %, seguido de tinción con Coomassie y *western blot*, usando un AcM anti-Fc de ratón-PO. La banda correspondiente a la proteína se detectó en los eluidos mediante *western blot*, pero no se identificó dicha banda en la tinción con Coomassie. Además, el nivel de pureza obtenido fue inferior al conseguido previamente al purificar la proteína a partir del SB (datos no mostrados). Debido a estos resultados, se descartó esta aproximación.

- **Mejora 3.** Diseño y expresión de un fragmento de la proteína:

Para mejorar el rendimiento, se expresó una versión más corta de la proteína, eliminando la parte más variable del dominio extracelular que se había identificado en el análisis de secuencias (Figura IV.5). Con tal finalidad, se amplificó la secuencia codificante de dicho fragmento a partir del gen sintético EP153R.II.1, utilizando los oligonucleótidos 3_D y 5_R. Estos cebadores incluyeron secuencias codificantes de un péptido espaciador (2x[4xGlySer]), una etiqueta 6xHis y un codón de parada en el extremo 3', para eliminar la secuencia correspondiente a la etiqueta Fc de ratón que añade el vector. El plásmido resultante, pCMV6-AC-FC-S/EP153R/2 (Tabla III.7), se utilizó para transfectar células de mamífero HEK-293-F. La cinética de expresión y el fraccionamiento celular se realizó de la misma forma que para el dominio extracelular completo. En este caso se utilizó un AcM anti-His para el análisis mediante *western blot*. Así, la proteína se detectó únicamente en la FS y la FI

del extracto celular, para todos los días analizados (datos no mostrados). La intensidad de la banda fue tan baja, que no se llevó a cabo el paso de purificación.

- **Mejora 4.** Cambio de la optimización de codones:

Se realizó una nueva optimización de codones del gen, siguiendo el patrón de tripletes de nucleótidos del gen sintético EP153R.I, con el que se había obtenido un buen rendimiento en la expresión (apartado IV. 1. 2. 3. 1). Así, el gen sintético EP153R.II.2 se amplificó utilizando los oligonucleótidos 6_D y 7_R. El amplicón se clonó en el vector pCMV6-AC-FC-S, empleando las enzimas AscI y XhoI. El vector recombinante resultante, pCMV6-AC-FC-S/EP153R/3 (Tabla III.7), se utilizó para la transfección de células HEK-293-F. La cinética y su análisis se realizaron según lo descrito anteriormente. En este caso, se observó la banda correspondiente a la pEP153R II-Fc tanto en *western blot*, como en la tinción del gel con Coomassie. La banda de mayor intensidad se detectó a 6 dpt (datos no mostrados). A partir del SB, se purificó la proteína mediante cromatografía de afinidad a proteína G. Como se muestra en la Figura IV.10, se detectó una banda ancha con la masa molecular esperada al analizar el eluido de la purificación en SDS-PAGE al 12 %, seguido de tinción con Coomassie.

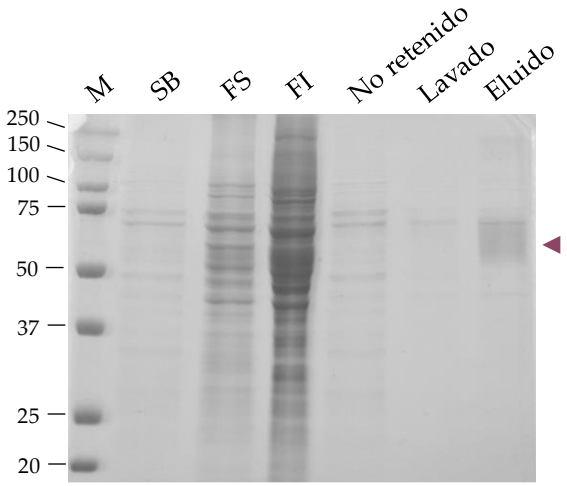


Figura IV.10. Análisis de la expresión y purificación de la proteína pEP153R II-Fc. SDS-PAGE-tinción Coomassie a los 6 días postransfección. SB: sobrenadante del cultivo celular, FS: fracción soluble, FI: fracción insoluble. Las flechas indican la altura de la banda correspondiente a la proteína de interés. Las masas moleculares del marcador (M) se expresan en kDa.

La identidad de la proteína se confirmó mediante *western blot*, usando un AcM anti-Fc de ratón-PO (datos no mostrados). A continuación, mediante densitometría se determinó que la pureza de la pEP153R II-Fc purificada era cercana al 100 % y se

cuantificó a 0,25 mg/ml. El rendimiento final obtenido fue de 1,6 mg de proteína en un volumen de cultivo de 100 ml, aumentando así su rendimiento más de 30 veces, respecto a la producción anterior.

Una vez mejorado el rendimiento de la expresión de la pEP153R de genotipo II, se comparó el funcionamiento de la proteína optimizada (pEP153R II-Fc) con el de la obtenida previamente (pEP153R II-TEV-Fc) en un ensayo de ELISA indirecto (Figura IV.11). Para ello, se analizaron 99 sueros de los descrito en la Tabla IV.2, procedentes de infecciones experimentales. Los datos mostraron una regresión lineal entre ambos ensayos (R^2: 0,94; valor p < 0,001), obteniéndose una línea recta con pendiente de 1,059 ± 0,024 y ordenada en el origen de -0,090 ± 0,024. Además, asumiendo un punto de corte preliminar para ambos ELISA de una DO superior a 0,5, la concordancia observada fue casi perfecta, con un valor *kappa* de 0,92 [IC 95 %: 0,82–0,98].

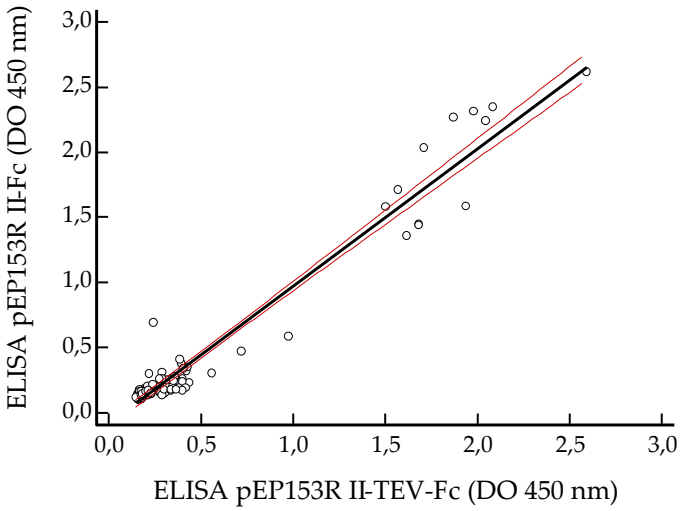


Figura IV.11. Comparativa de los dos antígenos recombinantes obtenidos de la pEP153R de genotipo II. El eje de ordenadas muestra la densidad óptica (DO) a 450 nm obtenida en el ELISA con el antígeno pEP153R II-Fc, procedente de la nueva optimización. El eje de abscisas, el valor de DO obtenido en el ensayo con el antígeno pEP153R II-TEV-Fc, para las mismas muestras de sueros analizadas. Las líneas rojas representan el intervalo de confianza para la regresión (95 %).

IV. 1. 2. 3 Proteína EP153R de genotipo I

IV. 1. 2. 3. 1 Producción de la pEP153R de genotipo I

La secuencia codificante del dominio extracelular de la proteína pEP153R del aislado BA71V, se amplificó mediante PCR a partir del gen sintético EP153R.I,

usando los oligonucleótidos 8_D y 9_R. Posteriormente, el producto de la PCR se **clonó** en el plásmido pCMV6-AC-FC-S, utilizando las enzimas de restricción AscI y XhoI. El producto final de la clonación fue el plásmido recombinante pCMV6-AC-FC-S/EP153R.I (Tabla III.7), que permitió la expresión extracelular de la proteína.

A continuación, se transfectaron **células de mamífero** HEK-293-F con el plásmido de expresión purificado y se evaluó la cinética de la expresión. Para ello, el cultivo se recogió y fraccionó a los días 3, 4, 5 y 6 dpt. Las fracciones obtenidas (SB, FS y FI) se separaron mediante SDS-PAGE al 12 % y posterior tinción con Coomassie. Así, se observó una banda ancha de aspecto glicosilado en la fracción del SB, que aumentaba progresivamente con el tiempo. En la Figura IV.12.a, se muestran las fracciones obtenidas a 6 dpt, día en el que se observó la banda de mayor intensidad. La identidad de esta banda se comprobó mediante *western blot*, utilizando un AcM anti-Fc de ratón-PO. En la FS y la FI también se detectó una banda que se identificó como la proteína de interés, pero de una altura inferior a la detectada en el SB, al igual que había ocurrido con la pEP153R de genotipo II.

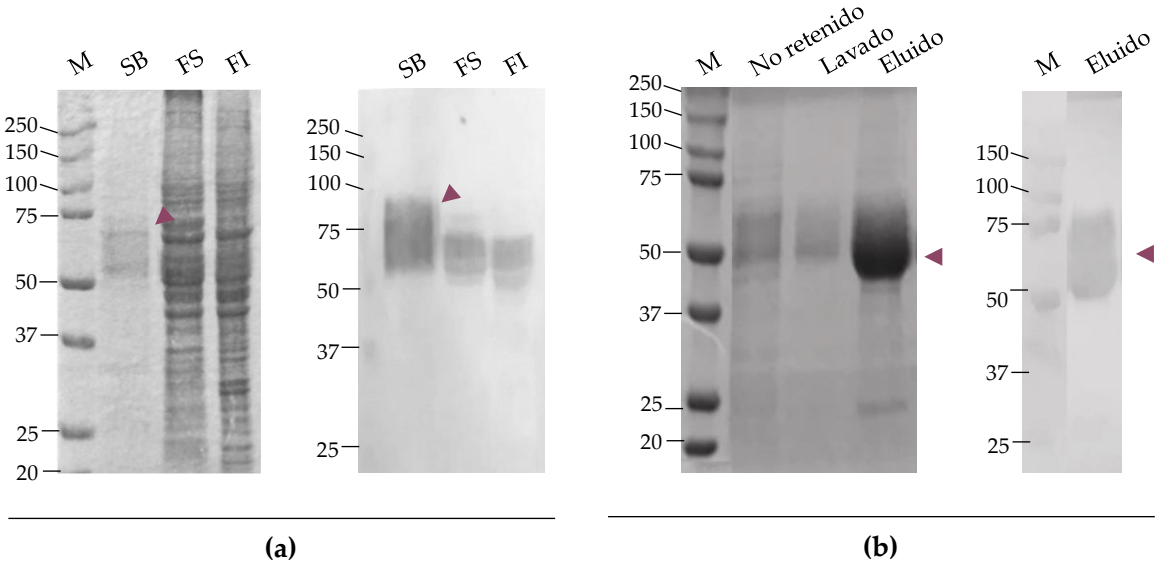


Figura IV.12. Análisis de la expresión y purificación de la pEP153R I-Fc. SDS-PAGE de: **(a)** fraccionamiento del cultivo a día 6 postransfección (SB: sobrenadante del cultivo celular, FS: fracción soluble, FI: fracción insoluble); **(b)** purificación de la proteína. En cada caso, el panel de la izquierda corresponde a la tinción con Coomassie y el de la derecha, al *western blot*, usando un AcM anti-Fc de ratón-PO. La flecha indica la banda correspondiente a la proteína. Las masas moleculares del marcador (M) se indican en kDa.

Posteriormente, se realizó un cultivo de mayor volumen (150 ml) que se recogió al sexto día postransfección. La proteína se purificó a partir del SB, mediante

cromatografía de afinidad a proteína G (Figura IV.12.b). La proteína se obtuvo a un grado de pureza cercano al 100 % y a una concentración de 0,24 mg/ml. El rendimiento de la expresión fue de 1,7 mg para un volumen de cultivo de 100 ml.

IV. 1. 2. 3. 2 Análisis de la antigenicidad de la pEP153R de genotipo I

El análisis de la antigenicidad se realizó mediante **ELISA indirecto**, realizando una optimización inicial de las condiciones del ensayo. Brevemente, se seleccionó una concentración de tapizado de 2 ng/µl y como conjugado, el AcM anti-IgG de cerdo 1BH7-PO. En este análisis se utilizaron sueros negativos (0 dpi) y positivos (≥ 22 dpi) del Grupo D (Tabla III.11), procedentes de animales experimentales infectados con diferentes aislados del vPPA (Tabla IV.3). Todas las muestras habían sido caracterizadas previamente en el ensayo INgezim® PPA Compac.

Tabla IV.3. Sueros utilizados en la optimización del ELISA indirecto de la pEP153R de genotipo I.

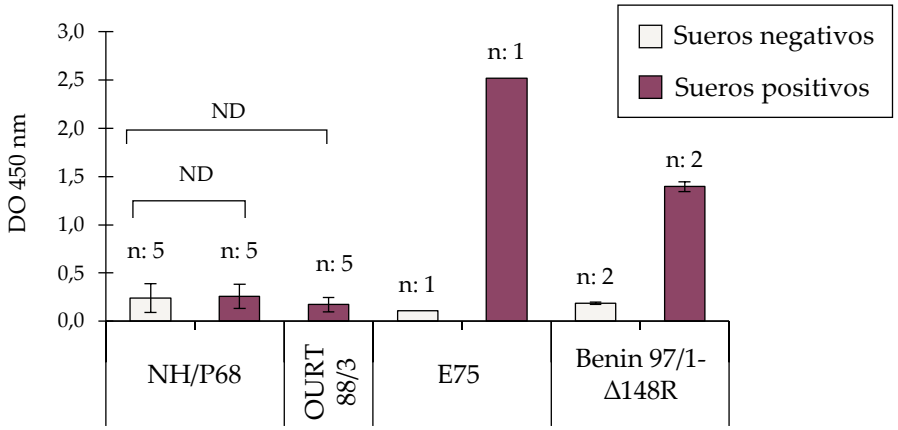
Aislado del vPPA	No. de animales	No. de muestras		
		Negativos	Positivos	
		0 dpi	(0-30] dpi	≥ 30 dpi
NH/P68	3	3	0	3
OURT 88/3	5	0	1	4
E75	1	1	1	0
Benin 97/1-Δ148R	2	2	2	0

Caracterización de las muestras en el ensayo INgezim® PPA Compac. dpi: días posinfección

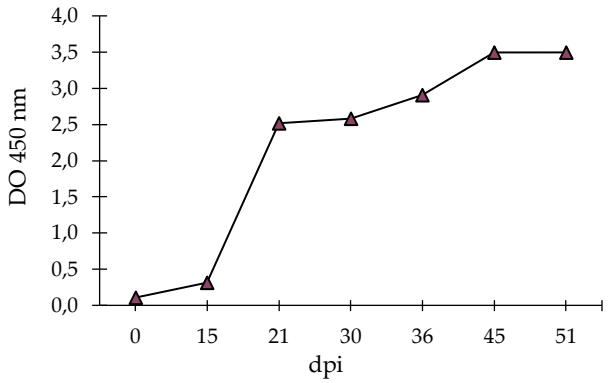
Como se muestra en la Figura IV.13.a, a pesar de la optimización del ensayo, no se consiguió detectar señal frente a la pEP153R de genotipo I en muestras procedentes de animales infectados con los aislados NH/P68 y OURT 88/3. Por el contrario, sí se detectó señal diferencial entre muestras negativas y positivas procedentes de los animales infectados con el vPPA E75 o Benin 97/1-Δ148R. Tras este resultado y con el objetivo de determinar la **cinética de seroconversión** frente a la pEP153R de genotipo I, se analizaron todos los sueros disponibles para el animal infectado con el aislado E75. Como se observa en la Figura IV.13.b, en este animal, se detectaron anticuerpos frente al antígeno a partir de los 21 dpi, manteniendo un nivel alto hasta la última muestra analizada (51 dpi). Además, los sueros se analizaron en el ELISA indirecto que detecta anticuerpos frente a la pEP153R de

genotipo II, resultando todas las muestras negativas, con señales de DO menores de 0,2 (datos no mostrados).

Estos resultados revelaron que las muestras de suero procedentes de animales infectados con los aislados NH/P68 y OURT 88/3 no reconocían la proteína pEP153R I-Fc; mientras que los infectados con E75 y Benin 97/1-Δ148R, sí desarrollarían una respuesta específica de anticuerpos frente a este antígeno.



(a)



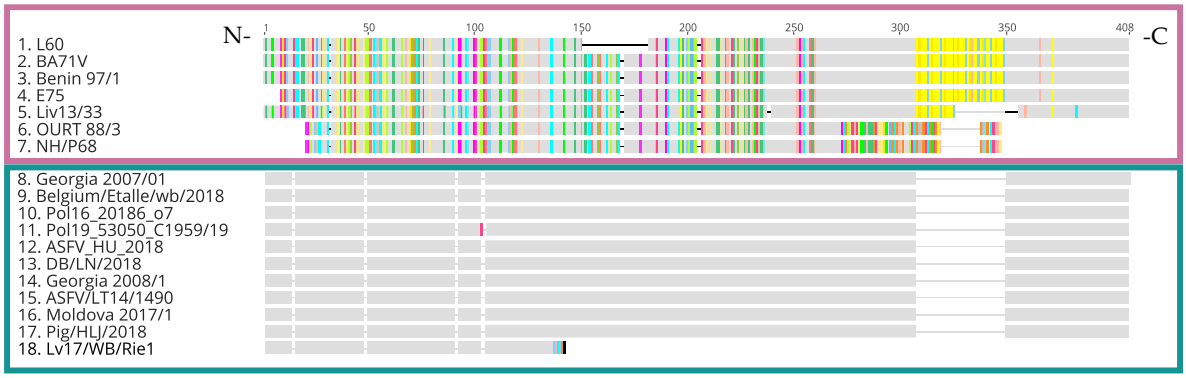
(b)

Figura IV.13. Análisis de la antigenicidad de la pEP153R de genotipo I, mediante ELISA indirecto. (a) El eje de ordenadas representa la densidad óptica (DO) obtenida en el ensayo, y el eje de abscisas muestra los sueros procedentes de infecciones con distintos aislados del vPPA. Las barras representan la media de la DO ± desviación estándar; n: número de muestras. Valor de significancia estadística: prueba U de Mann-Whitney o prueba Wilcoxon (ND: sin diferencias); **(b)** cinética de un cerdo infectado con el aislado E75. El eje de ordenadas representa la DO obtenida en el ensayo, y el eje de abscisas muestra los sueros recogidos a distintos días posinfección (dpi).

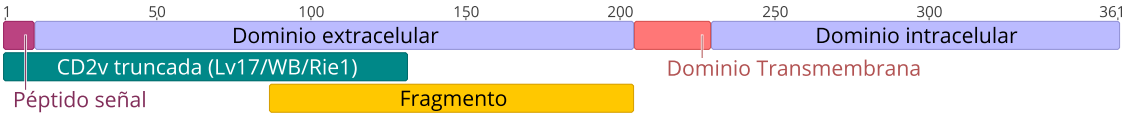
IV. 1. 3 Proteína CD2v

IV. 1. 3. 1 Análisis de secuencias de la proteína CD2v

El **alineamiento múltiple** de las secuencias de la proteína CD2v de diferentes vPPA de genotipo I y II, reveló una agrupación de las secuencias entre genotipos y su conservación elevada entre aislados pertenecientes al mismo genotipo (Figura IV.14.a). Este análisis permitió también identificar una región del dominio extracelular con un mayor porcentaje de identidad entre los dos genotipos, que fue seleccionada para su posterior expresión (Figura IV.14.b).



(a)



(b)

Figura IV.14. *Análisis de las secuencias de la proteína CD2v.* **(a)** Alineamiento múltiple de las secuencias de la proteína CD2v de diferentes aislados del vPPA de genotipo I (rectángulo rosa) y de genotipo II (rectángulo azul). Los residuos aminoacídicos diferentes a la secuencia de referencia, Georgia 2007/1, se muestran coloreados (cada color representa un aminoácido diferente); **b)** anotación de la proteína CD2v de la cepa Georgia 2007/1.

Con el objetivo de favorecer el proceso de expresión y purificación, así como por ser la región de la proteína más expuesta en el virus, se seleccionó el dominio extracelular de la proteína CD2v del **vPPA Georgia 2007/1** (genotipo II) para su expresión heteróloga (Figura IV.14.b). No se trabajó con la secuencia del vPPA Lv17/WB/Rie1, debido a que este aislado presenta una forma truncada de la proteína CD2v, causada por una mutación puntual que introduce un codón de parada temprano [106].

Además, se predijeron los **sitios potenciales de glicosilación** para el dominio extracelular de la proteína del aislado seleccionado. Este análisis reveló 11 sitios potenciales de N-glicosilaciones.

IV. 1. 3. 2 Producción recombinante de la proteína CD2v

La secuencia del gen sintético EP402R.1 se amplificó mediante PCR, usando las parejas de oligonucleótidos 10_D/11_R y 12_D/11_R. El primer producto de amplificación se clonó en el vector de expresión pAcHLTA/GW, mientras que el segundo, cuyo oligonucleótido directo había introducido una etiqueta 6xHis en el extremo 5' del gen, en el vector pAcGP67/GW. Ambas clonaciones se realizaron utilizando el sistema Gateway™. Por otro lado, la secuencia del gen EP402R.2 se amplificó utilizando los oligonucleótidos 13_D y 14_R y, a continuación, se clonó en el vector de expresión pCMV6-AC-FC-S, utilizando las enzimas de restricción AscI y XhoI. Finalmente, los plásmidos recombinantes obtenidos fueron: pAcHLTA/GW/EP402R, pAcGP67/GW/EP402R y pCMV6-AC-FC-S/EP402R/1 (Tabla III.7). El primer plásmido se utilizó para la expresión intracelular de la proteína en células de insecto, mientras que los otros dos se emplearon la expresión extracelular en células de insecto y mamífero, respectivamente.

Respecto a la expresión en **células de insecto**, los plásmidos pAcHLTA/GW/EP402R y pAcGP67/GW/EP402R se utilizaron para generar y aislar los baculovirus recombinantes AcHLTA/EP402R y AcGP67/EP402R, respectivamente (Tabla III.2). Para ello, se siguió el procedimiento descrito en el apartado III. 2. 3. 2 de M&M. Brevemente, se aislaron 6 clones de cada baculovirus recombinante, que se emplearon para infectar células de insecto. Tras la recogida de los cultivos celulares infectados, se analizaron los perfiles proteicos de las distintas fracciones con el objetivo de seleccionar el clon de baculovirus que mejor rendimiento producía en cada caso.

En primer lugar, el análisis de las expresiones correspondientes a los 6 clones del baculovirus **AcGP67/EP402R**, no mostró ninguna banda mayoritaria en SDS-PAGE al 12 %, seguido de una tinción con Coomassie, en comparación con las observadas en el control negativo. En la Figura IV.15.a se muestran los resultados obtenidos en las expresiones con 3 de los 6 clones. Además, se hizo un análisis mediante *western blot*, utilizando un suero de referencia positivo a anticuerpos anti-vPPA, seguido de un AcM anti-IgG de cerdo marcado (1BH7-PO). Como muestra la Figura IV.15.b, se observó una banda en la FI, con una masa molecular aproximada a la esperada de forma teórica (30,1 kDa), así como una banda de mayor

masa molecular y de aspecto ancho y difuso entre 60–75 kDa. Todos los clones analizados mostraron unos niveles de expresión similares.

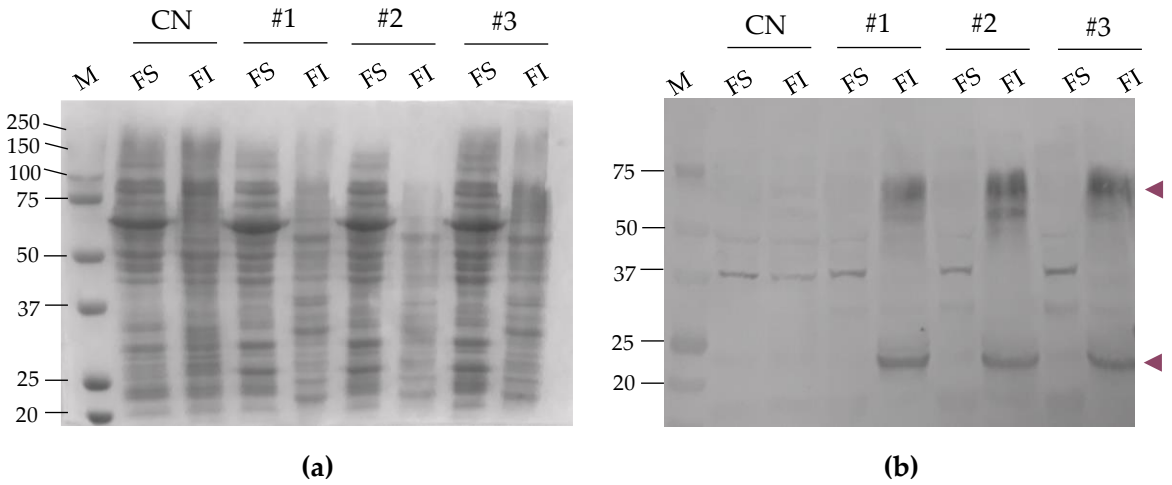


Figura IV.15. Análisis de la expresión de la proteína His-CD2v en células de insecto. SDS-PAGE seguido de: **(a)** tinción con Coomassie; **(b)** *western blot*, utilizando un suero positivo a anticuerpos frente al vPPA. #1, #2 y #3: clones del baculovirus recombinante AcGP67/EP402R; CN: control negativo, FS: fracción soluble, FI: fracción insoluble. Las masas moleculares del marcador (M) se indican en kDa. La flecha indica la altura de las bandas correspondientes a la proteína.

Posteriormente, se seleccionó aleatoriamente el baculovirus AcGP67/EP402R #3, para la generación de un inóculo de alto título viral ($2{,}3 \cdot 10^8$ ufp/ml). Este inóculo se empleó para infectar células de insecto Sf900, a una mdi variable de 0,1 y 1,0. Los cultivos se recogieron a los 5 dpi y se fraccionaron (SB, FS y FI) para el análisis de la expresión de la proteína de interés, His-CD2v (Sf900). Dichas fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE al 12 %, seguido de una tinción del gel con Coomassie. En ambas expresiones, no se identificó ninguna banda mayoritaria en las tres fracciones analizadas, al igual que sucedió al realizar un *western blot* utilizando un AcM anti-His. Sin embargo, sí se visualizaron bandas al incubar la membrana con un suero positivo a anticuerpos frente al vPPA en la FI de ambas expresiones, similares a las observadas previamente en la Figura IV.15.b. Dado que las proteínas suelen estar muy diluidas en el medio de cultivo (SB), se trató de purificar la misma a partir de esta fracción, mediante IMAC. No se detectó proteína en la fracción eluida de la columna, cuando esta se evaluó por SDS-PAGE-tinción con Coomassie.

Respecto al baculovirus recombinante **AcHLTA/EP402R**, el análisis de los cultivos celulares infectados con los 6 clones permitió seleccionar el clon

AcHLTA/EP402R #6, por dar lugar a una mayor producción de la proteína de interés. A continuación, se generó un inóculo de alto título, que se tituló a $2{,}0 \cdot 10^8$ ufp/ml. Con este inóculo, se llevaron a cabo expresiones en células Sf9, utilizando distintas mdi y días de recogida. Tras la recogida de los cultivos, estos se fraccionaron, obteniendo la FS y la FI para cada una de las expresiones, que se analizaron mediante SDS-PAGE al 12 % seguido de tinción de Coomassie. Este análisis reveló una banda mayoritaria en la FI, con una masa molecular cercana a la masa molecular teórica predicha para la proteína (29,7 kDa), siendo de mayor intensidad para el cultivo infectado a una mdi de 2,0 y recogido a 4 dpi (Figura IV.16.a).

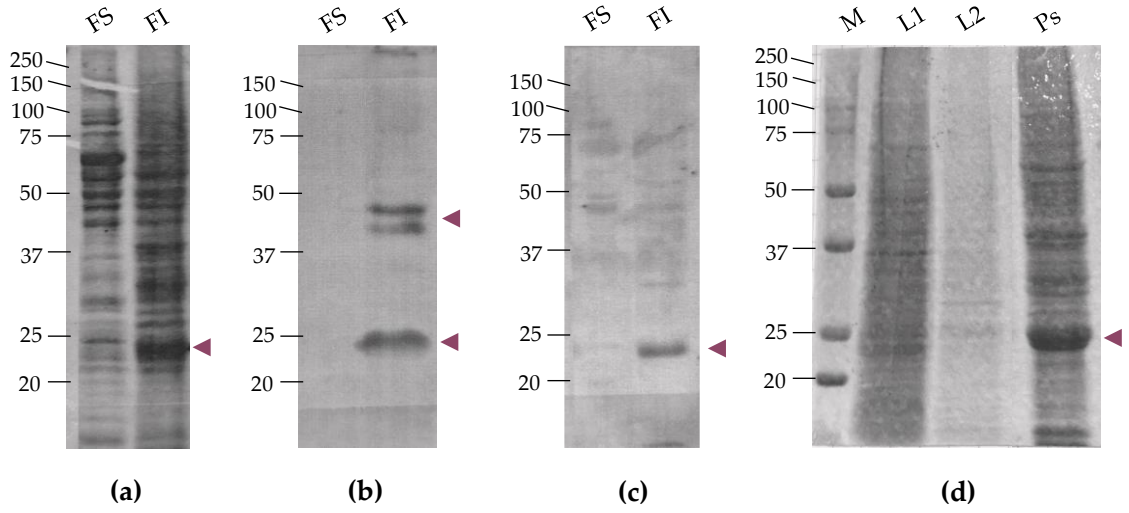


Figura IV.16. Análisis de la expresión de la proteína CD2v en células de insecto infectadas con AcHLTA/EP402R #6, mediante SDS-PAGE. (a) Tinción con Coomassie del análisis de la fracción celular soluble (FS) e insoluble (FI); **(b)** *western blot* de la FS y la FI, utilizando un AcM anti-His; **(c)** *western blot* de la FS y la FI, utilizando un suero positivo a anticuerpos frente al vPPA; **(d)** tinción con Coomassie de la proteína solubilizada (Ps) con sarcosilo. L1, L2: lavados. Las masas moleculares del marcador (M) se indican en kDa. Las flechas indican la altura de la banda correspondiente a la proteína de interés.

La identidad de la banda mayoritaria se comprobó mediante *western blot*, utilizando un AcM anti-His (Figura IV.16.b) o un suero de referencia positivo a anticuerpos frente al vPPA (Figura IV.16.c), revelando la membrana con un AcM anti-Fc de ratón-PO o un AcM anti-IgG de cerdo-PO (1BH7-PO), respectivamente. En el análisis con el AcM anti-His, se observaron dos bandas adicionales de mayor tamaño, correspondientes a una masa molecular de aproximadamente 40 kDa. A continuación, la FI se solubilizó con sarcosilo, siendo necesaria una concentración de detergente del 1,3 % (v/v). Como muestra la Figura IV.16.c, con este método de

solubilización se consiguió un rendimiento elevado y, aunque la proteína mayoritaria resultó ser la de interés, se visualizaron múltiples bandas correspondientes a proteínas contaminantes. Posteriormente, la proteína His-CD2v (Sf9) se purificó mediante IMAC; sin embargo, no se consiguieron los resultados esperados ya que la proteína no se unió a la resina, a pesar de la optimización del protocolo.

La banda correspondiente a la proteína de interés se cuantificó a 0,75 mg/ml, mediante densitometría de la tinción con Coomassie. Además, se midió la cantidad de proteína total con el método de BCA, obteniéndose un nivel de pureza del 20 %. El rendimiento de la expresión fue de 0,9 mg de proteína en 100 ml de cultivo.

En paralelo, el plásmido de expresión pCMV6-AC-FC-S/EP402R/1 se empleó para transfectar **células de mamífero** HEK-293-F. A continuación, se evaluó la cinética de la expresión, recogiendo y fraccionando el cultivo a los 3, 4 y 5 dpt. Las fracciones obtenidas (SB, FS y FI) se separaron mediante SDS-PAGE al 10 %. En la tinción posterior del gel con Coomassie, no se visualizó ninguna banda en el SB, así como tampoco una banda mayoritaria en la FS o la FI (datos no mostrados). Sin embargo, cuando la expresión se analizó mediante *western blot*, usando un AcM anti-Fc de ratón-PO, a los 4 dpt se pudo observar en la FS y la FI una banda de masa molecular aproximada de 75 kDa.

A continuación, se realizó la infección en un cultivo de mayor volumen (200 ml) que se recogió en las condiciones seleccionadas previamente. A pesar de no haberse observado en el análisis anterior una banda en el SB, se purificó la proteína a partir de esta fracción ya que el vector empleado añadía un péptido señal. La purificación se realizó mediante cromatografía de afinidad, utilizando una resina de proteína G. A continuación, se analizó la purificación mediante SDS-PAGE al 10 %, seguido de tinción con Coomassie y *western blot*, usando un AcM anti-Fc de ratón-PO. La proteína solamente se pudo detectar débilmente mediante *western blot*, pero la intensidad de la banda fue tan baja, que no se pudo cuantificar la proteína obtenida.

IV. 1. 3. 3 Análisis de la antigenicidad de CD2v

El análisis de la antigenicidad de la proteína CD2v se realizó mediante ELISA indirecto. Las versiones recombinantes His-CD2v (Sf9) tras su solubilización con sarcosilo, y la CD2v-Fc purificada por afinidad, se tapizaron a distintas

concentraciones o diluciones, respectivamente. En el ensayo, se emplearon 2 sueros experimentales procedentes de un animal infectado con el vPPA Es16/WB-Viru8, y recogidos a 0 dpi (negativo) y 72 dpi (positivo) (Grupo C, Tabla III.11). Las muestras habían sido previamente caracterizadas en el ensayo INgezim® PPA Compac. Para este estudio inicial de la antigenicidad, se utilizó como conjugado el AcM anti-IgG de cerdo 1BH7-PO. Como se muestra en la Figura IV.17, la diferencia de señal obtenida entre el suero negativo y positivo analizados fue mayor frente al antígeno CD2v-Fc. La especificidad de la señal se comprobó utilizando un antígeno negativo expresado y purificado en las mismas condiciones que la CD2v-Fc, sin detectarse señal frente a este (datos no mostrados).

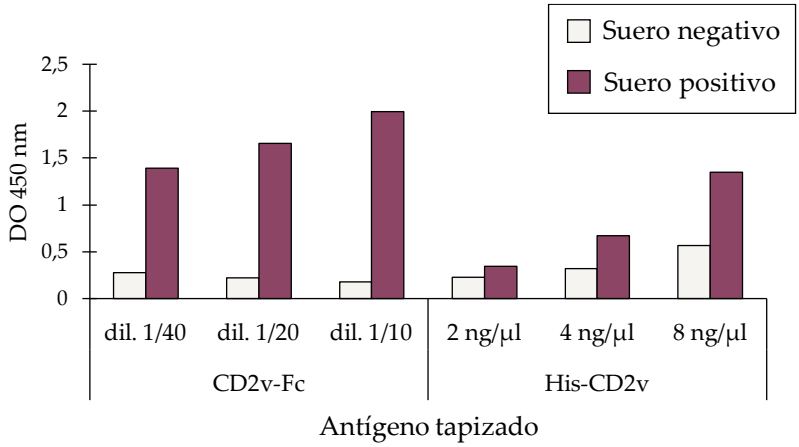


Figura IV.17. Análisis de la antigenicidad de la proteína CD2v mediante ELISA indirecto. El eje de ordenadas representa el valor de densidad óptica (DO) a 450 nm obtenido en el ensayo, y el eje de abscisas, la concentración o dilución tapizada de las dos versiones recombinantes de la proteína usadas como antígeno: His-CD2v (Sf9) o CD2v-Fc (mamífero). Las barras blancas corresponden a muestras de suero negativas y las oscuras, a muestras de suero positivas.

A la vista de estos resultados, se seleccionó el antígeno CD2v-Fc para seguir evaluando la antigenicidad de la proteína y comprobar la respuesta serológica específica frente a esta en infecciones provocadas por virus de distintos genotipos. Para ello, se emplearon 99 sueros procedentes de animales infectados con distintos aislados del vPPA de diferentes genotipos (Tabla IV.2): 6 animales con el vPPA Lv17/WB/Rie1 (genotipo II), 1 animal con el vPPA Es16/WB-Viru8 (genotipo II), 2 animales con el aislado NH/P68 (genotipo I) y 2 animales con el vPPA ET13/1504 (genotipo XXIII). La seroconversión de todos los animales frente a la proteína p72 se había comprobado previamente en el ensayo comercial INgezim® PPA Compac. Como muestra la Figura IV.18, se detectaron anticuerpos frente a la CD2v

únicamente en el animal infectado con el aislado Es16/WB-Viru8, a partir de los 27 dpi, mientras que no se detectó seroconversión frente al antígeno en los animales infectados con el aislado Lv17/WB/Rie1 (genotipo II) y con los aislados NH/P68 (genotipo I) y ET13/1504 (genotipo XXIII).

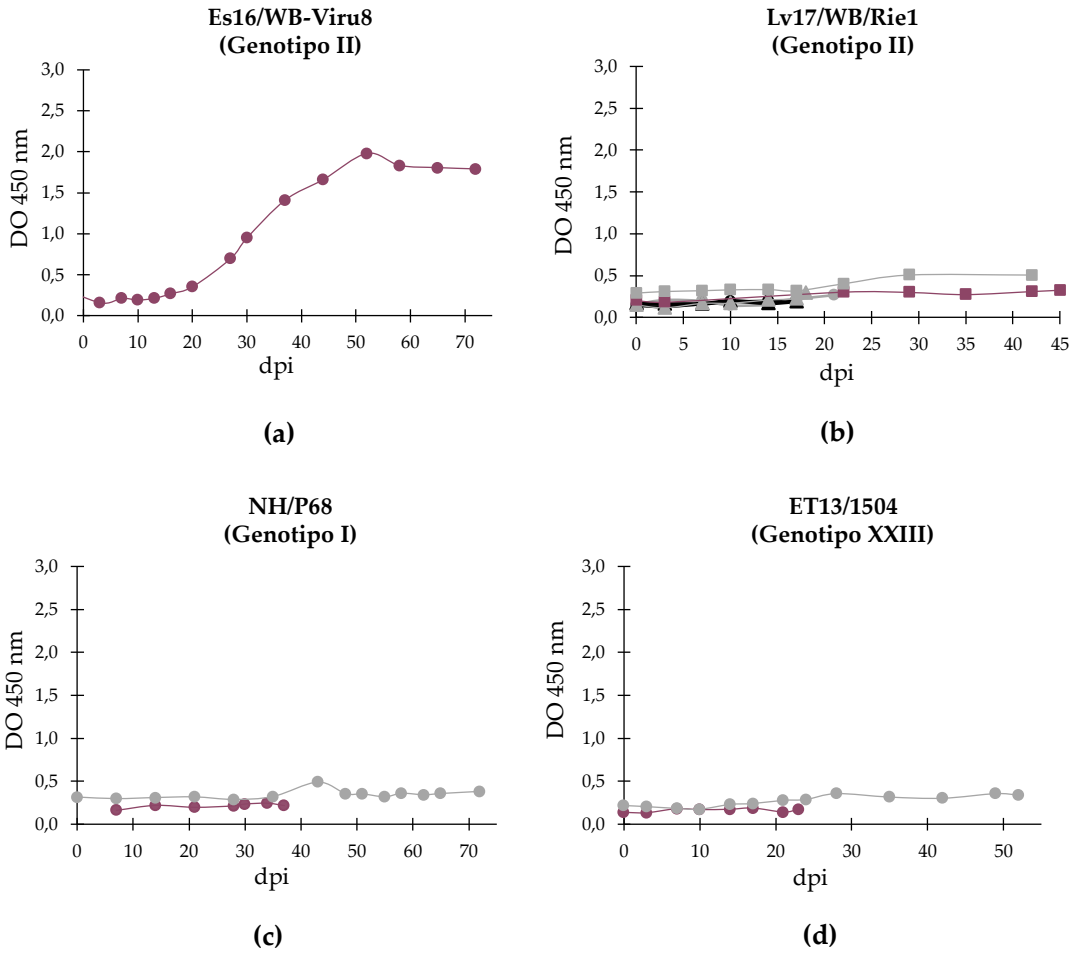


Figura IV.18. Análisis de la antigenicidad de la proteína CD2v en animales infectados experimentalmente con aislados del vPPA. (a) vPPA Es16/WB/Viru8 (genotipo II); **(b)** Lv17/WB/Rie1 (genotipo II); **(c)** NH/P68 (genotipo I); **(d)** ET13/1504 (genotipo XXIII). En todas las gráficas, en el eje de ordenadas, se muestra el valor de densidad óptica (DO) a 450 nm del ELISA indirecto y, en el eje de abscisas, los días posinfección (dpi). Cada línea representa muestras procedentes de un mismo animal.

IV. 1. 3. 4 Mejora del rendimiento de la expresión de la proteína CD2v

Puesto que el rendimiento de la expresión de la CD2v en células de mamífero fue muy bajo para su uso en el desarrollo de un inmunoensayo, se siguieron dos estrategias para su mejora. La primera consistió en realizar cambios en el proceso

de purificación y la segunda, en producir una versión más corta de la proteína. Ambas estrategias se describen a continuación:

- **Mejora 1.** Purificación partir de la FS:

La proteína CD2v-Fc presente en la FS recogida a los 4 dpt, se purificó mediante cromatografía de afinidad a Proteína G. La purificación se analizó mediante SDS-PAGE al 10 %, seguido de una tinción con Coomassie y *western blot*, usando un AcM anti-Fc de ratón-PO. En el análisis por *western blot*, se detectó la proteína de interés en los eluidos, aunque con una intensidad muy baja. Sin embargo, dicha banda no se identificó en la tinción con Coomassie (datos no mostrados). Además, el nivel de pureza obtenido fue inferior al conseguido previamente al purificar la proteína a partir del SB. Debido a estos resultados, se decidió descartar esta aproximación.

- **Mejora 2.** Diseño de un fragmento de la proteína:

Se expresó una versión más corta del dominio extracelular de la proteína CD2v, conservado entre los aislados del vPPA de genotipo I y II, identificado anteriormente en el análisis de secuencias (Figura IV.14). Para ello, se amplificó el fragmento codificante correspondiente a partir del gen sintético EP402R.2, utilizando los oligonucleótidos 15_D y 16_R, que introdujeron una etiqueta de 6xHis, separada por una secuencia codificante de un péptido espaciador (2x[4xGlySer]). Además, se incluyó un codón de parada para eliminar la secuencia correspondiente a la etiqueta Fc de ratón que añade el vector en el extremo 3'. Esta secuencia se clonó en el vector pCMV6-AC-FC-S, usando las enzimas de restricción AscI y XhoI.

El plásmido resultante, pCMV6-AC-FC-S/EP402R/2 (Tabla III.7), se utilizó para transfectar células HEK-293-F. La cinética de expresión, así como su análisis, se realizó de la misma forma previamente descrita para el dominio extracelular completo (CD2v-Fc), aunque en el *western blot* se empleó un AcM anti-His. Así, la proteína se detectó únicamente en la FS y la FI del extracto celular, para todos los días analizados. La intensidad de la banda fue tan baja, que no se procedió a la purificación.

IV. 1. 4 Proteína eGFP

IV. 1. 4. 1 Producción de la eGFP

La secuencia del gen sintético eGFP se amplificó mediante PCR usando los oligonucleótidos 23_D y 24_R. Posteriormente, el producto de la PCR se clonó en los vectores de expresión de *E. coli* pDEST™17 y pDEST™15, y el de baculovirus, pAcHLTA/GW, mediante el sistema Gateway™. Los plásmidos recombinantes resultantes fueron: pDEST™17/eGFP, pDEST™15/eGFP y pAcHLTA/GW/eGFP (Tabla III.7). El primer y tercer plásmido agregaron a la proteína la etiqueta 6xHis, mientras que el segundo, añadió la etiqueta GST.

Los plásmidos pDEST™17/eGFP y pDEST™15/eGFP se utilizaron para transformar células competentes de ***E. coli*** BL21 (DE3). En cada caso, se realizó una cinética de expresión a 37 °C para confirmar la expresión de la proteína y seleccionar el clon que más producía. Para ello, los perfiles proteicos a los distintos tiempos posinducción se evaluaron mediante SDS-PAGE al 12 % y posterior tinción con Coomassie y *western blot*, utilizando un AcM anti-His o anti-GST, según la etiqueta correspondiente. Así, se comprobó que una banda con el tamaño teórico predicho para ambas versiones de las proteínas aumentaba con el tiempo (His-eGFP: 30,0 kDa; GST-eGFP: 55,1 kDa). Tras la selección del clon, se procedió a realizar una expresión a baja temperatura (18 °C), para favorecer la forma soluble de la proteína. Las células se recogieron y fraccionaron, observándose en ambos casos una banda correspondiente a la proteína recombinante en la FS. Las proteínas se purificaron mediante columna de afinidad de níquel y glutatión, según la etiqueta de cada caso. La cuantificación de ambas versiones recombinantes se muestra en la Figura IV.19.

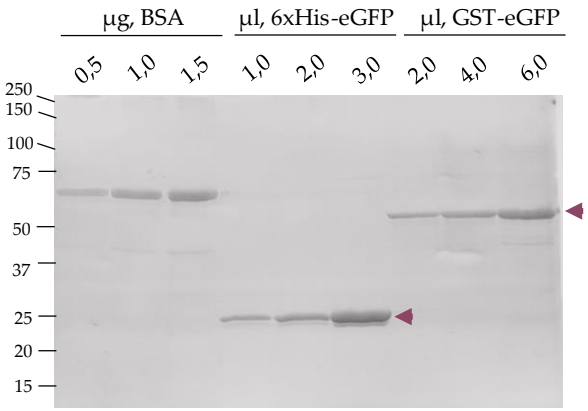


Figura IV.19. Cuantificación de las proteínas eGFP expresadas en *E. coli*. Densitometría de SDS-PAGE-tinción con Coomassie. Carriles 1-3: curva patrón de BSA; carriles 4-6: tres volúmenes de la proteína GST-eGFP; carriles 7-9: tres volúmenes de la proteína His-GFP. Las masas moleculares de las bandas del marcador (M) se expresan en kDa.

De forma paralela, se cotransfectaron **células de insecto**, Sf9, con el ADN del baculovirus parental y el plásmido recombinante pAcHLTA/GW/eGFP. Tras observarse la infección de las células a los 10 dpt, se realizó el aislamiento de 4 clones del baculovirus recombinante. A continuación, células Sf9 se infectaron con los baculovirus aislados y, tras visualizarse al microscopio óptico morfología de infección (4 dpi), se analizaron los perfiles proteicos de las células infectadas, mediante SDS-PAGE al 12 %, seguido de tinción con Coomassie y *western blot*, utilizando un AcM anti-His. Este análisis reveló una banda de la masa molecular teórica predicha para la proteína (32,6 kDa), permitiendo seleccionar el clon con el que se observó la mejor expresión de la proteína, para la obtención del inóculo de alto título. Así, el título obtenido para el inóculo fue de $2{,}5 \cdot 10^8$ ufp/ml. Con este inóculo se llevó a cabo la expresión final de la proteína a mdi de 1,5 y recogida a los 3 dpi, tiempo al que se observó una señal fluorescente intensa cuando las células se visualizaron al microscopio con luz UV (Figura IV.20.a). Tras el fraccionamiento celular, la proteína se purificó a partir de la FS mediante IMAC (Figura IV.20.b).

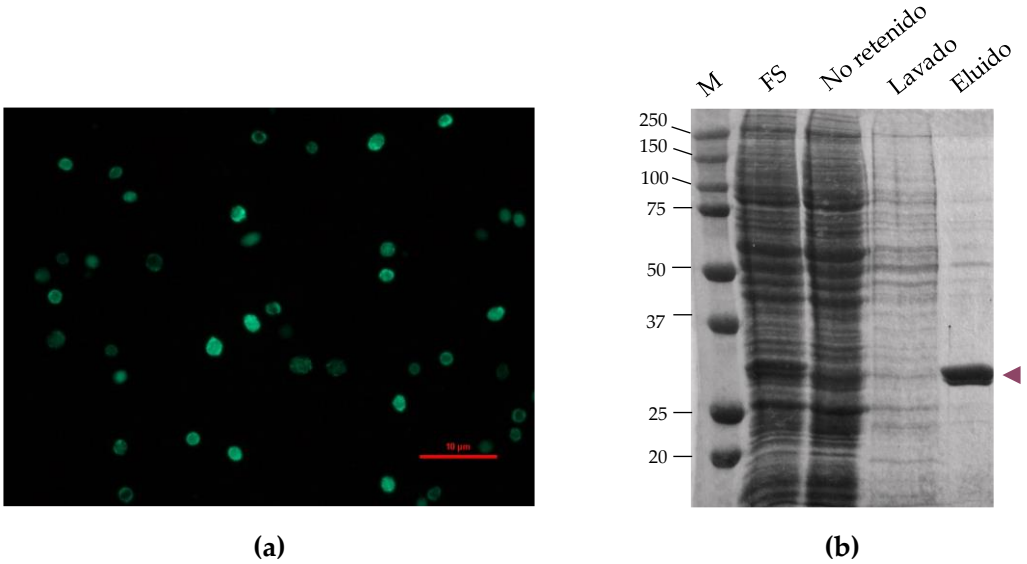


Figura IV.20. Análisis de la expresión y purificación de la proteína His-eGFP (Sf9). (a) Imagen del cultivo de células Sf9 a 3 días posinfección (60 mseg de exposición, a una longitud de onda de excitación de 200 nm), escala (línea roja): 10 μm; **(b)** análisis de la purificación por SDS-PAGE-tinción con Coomassie. Las masas moleculares del marcador (M) se muestran en kDa. La flecha señala la altura de la banda correspondiente a la proteína de interés.

Cada una de las tres versiones recombinantes de la proteína eGFP se cuantificó y se determinó su grado de pureza y rendimiento. En la Tabla IV.4 se indican los resultados obtenidos.

Tabla IV.4. Características de las versiones recombinantes de la proteína eGFP.

Versión recombinante de la eGFP	Grado de pureza (%)	Concentración (mg/ml)	Rendimiento (mg/100 ml cultivo)
His-eGFP (*E. coli*)	100	0,6	1,0
GST-eGFP (*E. coli*)	90	0,3	2,3
His-eGFP (Sf9)	100	0,6	1,4

IV. 1. 4. 2 Análisis de la antigenicidad de la eGFP

Una vez producida la eGFP, se llevó a cabo el análisis de su antigenicidad mediante ELISA indirecto y *western blot*. Las muestras utilizadas en los análisis fueron sueros procedentes de cerdos domésticos vacunados experimentalmente (Grupo A2, Tabla III.11), recogidos a diferentes dpv y caracterizados como positivos o negativos en el INgezim® PPA Compac.

En el análisis de la antigenicidad en ELISA indirecto, se utilizaron las mismas condiciones para las tres versiones recombinantes de la eGFP: el antígeno tapizado a 2 ng/µl en placas de 96 pocillos, las muestras de suero diluidas a la 1/100 y como conjugado se seleccionó la proteína A/G-PO diluida en solución de bloqueo, 0,5 M NaCl. Como se observa en la Figura IV.21.a, se observó una señal diferencial entre las muestras negativas (0 dpv) y positivas (≥ 16 dpv) analizadas, observándose un aumento en el nivel de anticuerpos a media que aumentaban los dpv. Además, la respuesta también se evaluó frente a un antígeno negativo expresado y purificado en las mismas condiciones que cada una de las formas recombinantes de la eGFP, no detectándose señal frente a estos con ninguna de las muestras analizadas (datos no mostrados). Debido a que las tres versiones recombinantes tuvieron un comportamiento similar, se seleccionó la proteína GST-eGFP para continuar con el desarrollo del inmunoensayo, por ser con la que se obtuvo mayor rendimiento en la expresión/purificación (Tabla IV.4).

La antigenicidad también se evaluó mediante *western blot*. Para ello, se analizó la señal de un suero positivo y negativo frente a 250 ng de la proteína GST-eGFP, la misma cantidad de un antígeno negativo y de proteína A/G, que se incluyó como control positivo en ambas membranas. Los AcM anti-IgG de cerdo 1BH7 y anti-Fc de ratón-PO se utilizaron como anticuerpo primario y secundario, respectivamente. Como se muestra en la Figura IV.21.b, al revelar la membrana con el suero positivo, se detectó una banda del tamaño esperado para la proteína, mientras que no se

visualizó ninguna banda al utilizar el suero negativo. Además, no se detectó señal frente al antígeno negativo con ninguno de los sueros analizados.

Por tanto, estos resultados mostraron que los cerdos vacunados con la vacuna candidata que contiene el gen eGFP en su genoma, desarrollaban anticuerpos frente a las diferentes versiones recombinantes del antígeno.

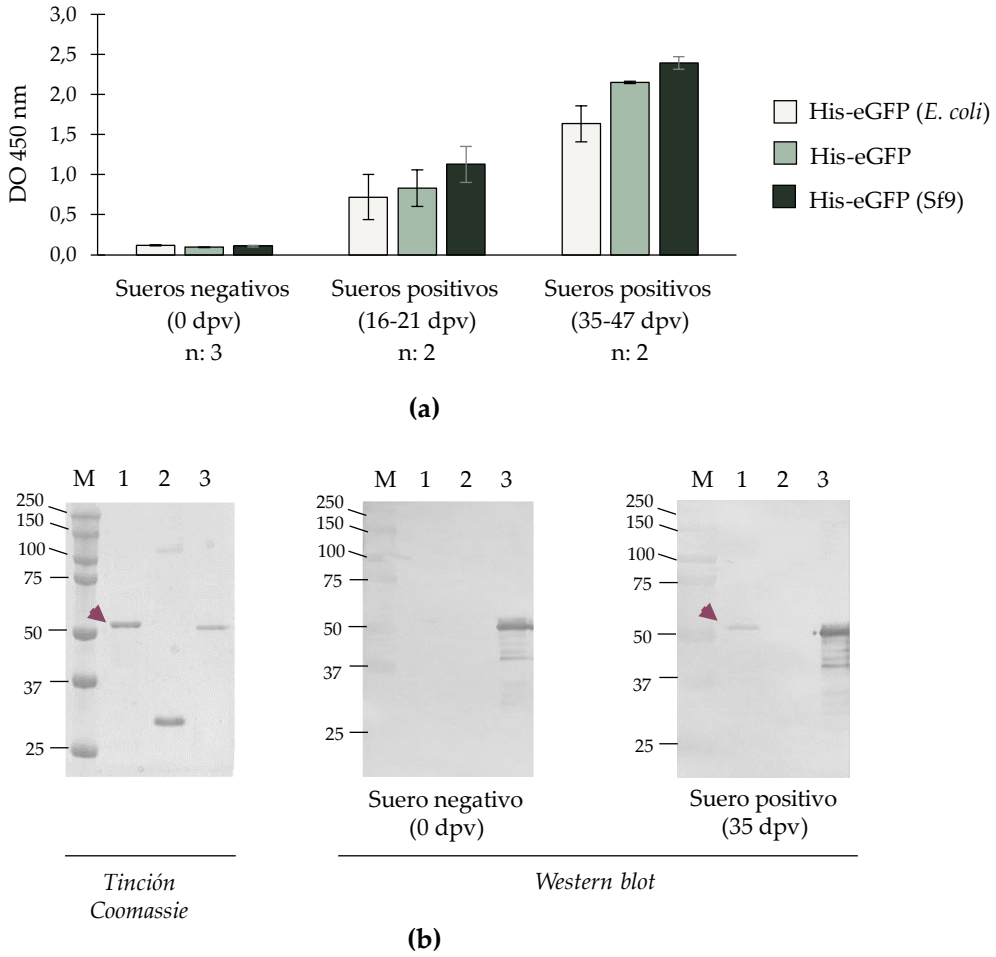


Figura IV.21. Análisis de la antigenicidad de la proteína eGFP. (a) ELISA indirecto: se representa la media de la densidad óptica (DO) a 450 nm obtenida con las distintas muestras de sueros, frente a los antígenos His-eGFP (*E. coli*), GST-eGFP o His-eGFP (Sf9) ± desviación estándar entre el número de muestras analizadas (n); **(b)** SDS-PAGE seguido de tinción con Coomassie o *western blot* (sueros de cerdos, revelados con AcM anti-IgG de cerdo, 1BH7, + AcM anti-Fc de ratón): 1- GST-eGFP, 2- antígeno negativo, 3- proteína A/G. La flecha indica la banda correspondiente a la proteína GST-eGFP. Las masas moleculares del marcador (M) se indican en kDa. En los análisis se emplearon sueros negativos (0 dpv) y sueros positivos (≥ 16 dpv). dpv: días posvacunación.

IV. 1. 5 Proteína mCherry

IV. 1. 5. 1 Expresión de mCherry

La secuencia del gen sintético mCherry se amplificó mediante PCR, usando los oligonucleótidos 25_D y 26_R. El gen amplificado se clonó en los vectores de expresión pDEST™17 y pAcHLTA/GW, utilizando el sistema Gateway®. De este modo, se generaron los plásmidos recombinantes pDEST™17/mCherry y pAcHLTA/GW/mCherry (Tabla III.7), para la expresión en *E. coli* y células de insecto, respectivamente. Ambos plásmidos agregaron la etiqueta 6xHis en el extremo amino-terminal de la proteína de interés. A continuación, el procedimiento seguido para la expresión fue el mismo que el descrito previamente para la proteína eGFP (apartado IV. 1. 4. 1).

Así, respecto a la **expresión en *E. coli***, en la cinética de expresión a 37 °C para la colonia seleccionada, se observó un aumento progresivo en la cantidad de proteína acumulada (Figura IV.22.a). Posteriormente, se llevó a cabo una expresión a baja temperatura (18 °C) y, tras el fraccionamiento celular, se detectó proteína en la FS. Esta fracción se utilizó para la posterior purificación de la proteína mediante IMAC (Figura IV.22.b). En todo el proceso, la identidad de la proteína se comprobó mediante *western blot*, utilizando un AcM anti-His. Finalmente, la proteína se obtuvo a un alto nivel de pureza cercano al 100 %, a una concentración de 1,6 mg/ml, y rendimiento de 6,4 mg de proteína en 100 ml de cultivo.

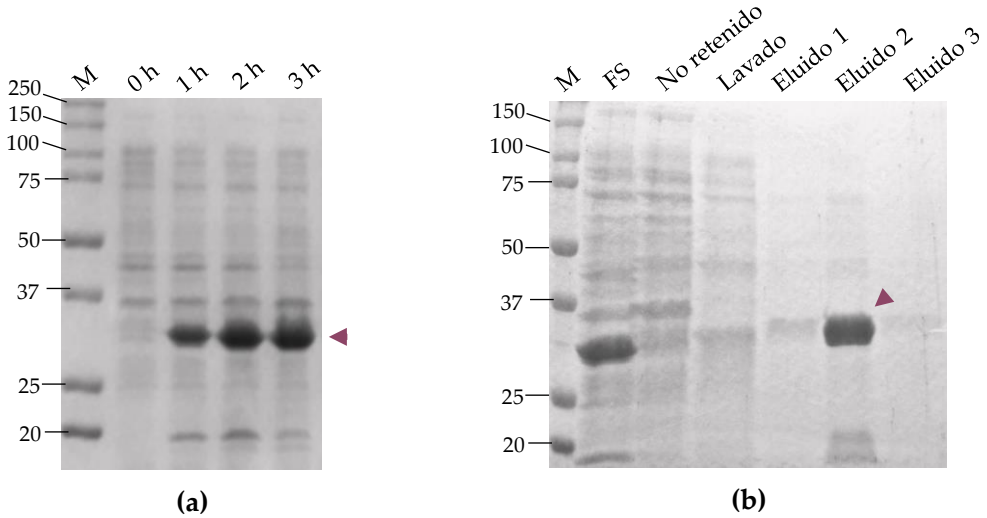


Figura IV.22. Análisis de la expresión y purificación de la proteína His-mCherry (*E. coli*). (a) cinética de expresión a 37 °C de la colonia seleccionada; **(b)** purificación mediante IMAC. Los paneles de la izquierda muestran el SDS-PAGE-tinción Coomassie y los de la derecha, el *western blot*, utilizando un anticuerpo anti-His.

De forma paralela, la proteína se expresó también en **células de insecto**. Para ello, se generaron baculovirus recombinantes AcHLTA/GW/mCherry. Tras el aislamiento de 4 clones, se infectaron células Sf9. Transcurridos 6 dpi, se observó morfología de infección al microscopio óptico. El análisis inicial de la expresión se realizó de la misma forma que la descrita previamente para la proteína eGFP. Se seleccionó el clon que expresaba más cantidad de proteína en forma soluble para preparar el inóculo de alto título ($5{,}0 \cdot 10^7$ ufp/ml), con el que se llevó a cabo la expresión a mdi de 1 y 3 dpi. Tras recoger el cultivo y fraccionar las células, la proteína se detectó nuevamente en la FS (Figura IV.23.a), que se utilizó para su posterior purificación mediante IMAC (Figura IV.23.b). La proteína se obtuvo a un menor nivel de pureza respecto a la obtenida en *E. coli* (aproximadamente 80 %), a una concentración de 0,22 mg/ml y rendimiento de 0,8 mg de proteína en 100 ml de cultivo.

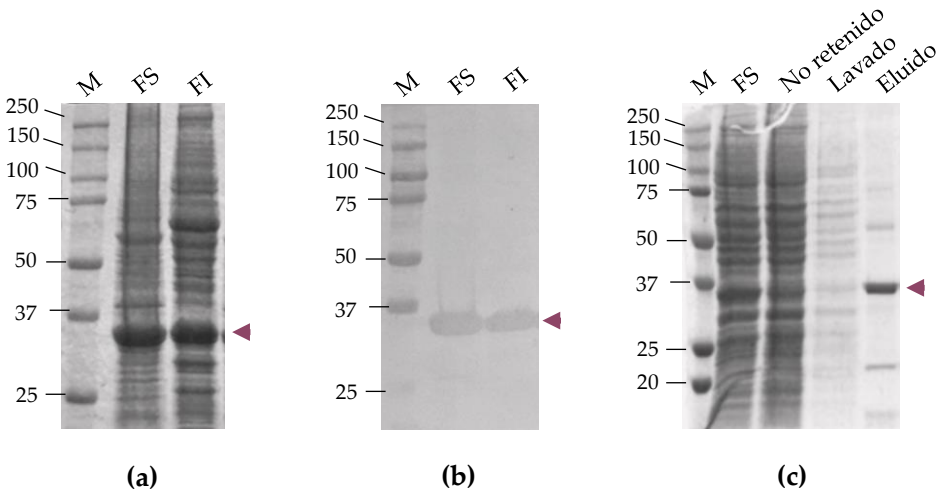


Figura IV.23. Análisis de la expresión y purificación de la proteína His-mCherry (Sf9) mediante SDS-PAGE. (a) Tinción con Coomassie de la fracción celular soluble (FS) e insoluble (FI); **(b)** *western blot* (AcM anti-His) de la FS y la FI; **(c)** tinción con Coomassie de la purificación mediante IMAC. Las masas moleculares del marcador (M) se expresan en kDa. Las flechas indican la altura de la banda correspondiente a la proteína de interés.

IV. 1. 5. 2 Análisis de la antigenicidad de la proteína mCherry

El análisis de la antigenicidad se realizó mediante ELISA indirecto. Para ello, se tapizaron a distintas diluciones las dos versiones de la proteína obtenidas: His-mCherry (*E. coli*) y His-mCherry (Sf9). Para la optimización del ensayo, se utilizó un suero negativo (0 dpv) y otro positivo (14 dpv) procedentes de un animal vacunado experimentalmente con el prototipo vacunal Lv17/WB/Rie1-ΔUK (Grupo A4, Tabla III.11). Todas las muestras habían sido previamente caracterizadas en el

ensayo comercial INgezim® PPA Compac. La concentración de tapizado seleccionada fue 0,4 ng/µl, detectándose una diferencia entre la señal obtenida con el suero negativo y el positivo, muy similar para ambas versiones de la proteína (Figura IV.24.a). La respuesta también se analizó frente a un antígeno negativo, no detectándose señal en ningún caso. Posteriormente, se evaluó la especificidad preliminar de ambos ensayos, analizando 66 sueros negativos de campo. Como muestra la Figura IV.24.b, aunque prácticamente todos los sueros resultaron negativos (DO < 0,4), uno de ellos dio un valor de DO más elevado (0,88) frente a la mCherry expresada en *E. coli*.

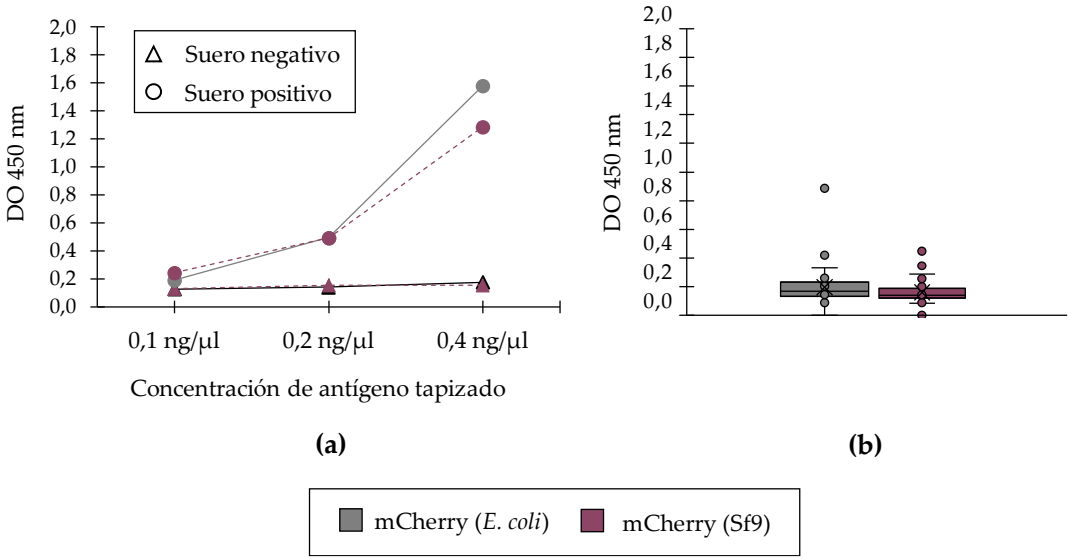


Figura IV.24. Estudio de la antigenicidad de la mCherry mediante ELISA indirecto, frente a las versiones recombinantes His-mCherry (*E. coli*) e His-mCherry (Sf9). (a) El eje de ordenadas representa la densidad óptica (DO) a 450 nm y el eje de abscisas, la concentración de antígeno tapizada. Se analizó un suero negativo (triángulo) y uno positivo (círculo); **(b)** Se representa la DO a 450 nm frente a cada uno de los antígenos, obtenida con 66 sueros negativos de campo.

Los resultados obtenidos indicaron que ambas versiones recombinantes de la proteína mCherry eran reconocidas de manera específica por sueros de cerdos vacunados con una vacuna candidata con el gen mCherry como marcador.

IV. 1. 6 Producción de anticuerpos monoclonales frente a la proteína eGFP

Con el objetivo de mejorar la sensibilidad de los inmunoensayos desarrollados donde se empleaba la eGFP, se produjeron AcM frente a esta proteína. Además,

estos AcM se emplearon como reactivos control para poner a punto el LFA eGFP desarrollado, descrito en el apartado IV. 4. 1. 1.

IV. 1. 6. 1 Obtención de anticuerpos monoclonales

La proteína His-eGFP (Sf9) se empleó para inmunizar ratones BALB/c. Tras cuatro inmunizaciones, se evaluó el título de cada uno de los ratones mediante ELISA indirecto. Brevemente, se utilizó como antígeno la proteína His-eGFP (Sf9), así como un antígeno no relacionado expresado y purificado en las mismas condiciones. Los sueros de los ratones se incubaron en diluyente de muestra de ELISA, durante 1 h a 37 °C y como conjugado, se utilizó el AcM anti-Fc-PO. El ensayo se reveló con el sustrato ABTS durante 10 min. En la Figura IV.25 se representa el título de los cuatro ratones frente a la His-eGFP (Sf9), restando la señal obtenida frente al antígeno negativo. De esta forma, se seleccionaron los ratones 3 y 4 para el proceso de fusión, por ser los de mayor título de anticuerpos.

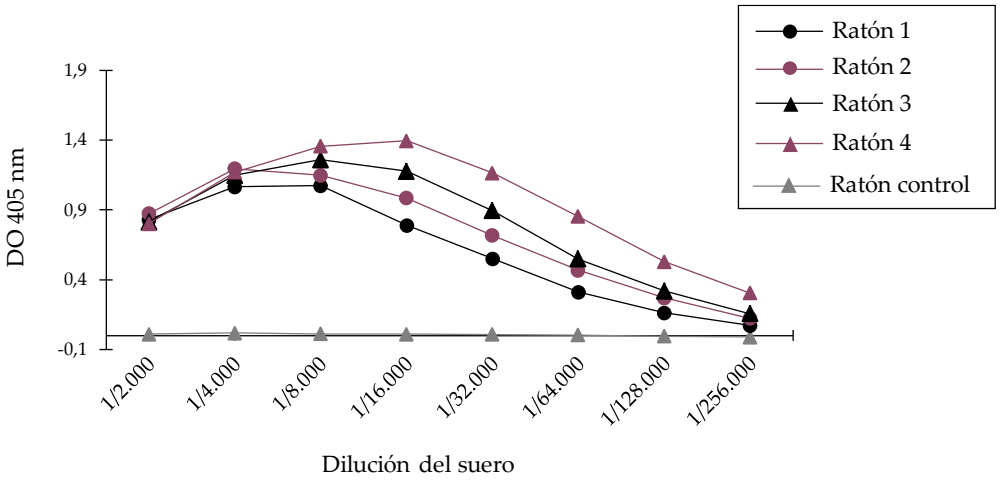


Figura IV.25. Titulación en ELISA indirecto de los sueros procedentes de ratones inmunizados con eGFP. En el eje de ordenadas, se representa la diferencia obtenida entre la densidad óptica (DO) frente a la eGFP y frente a un antígeno negativo y, en el eje de abscisas, la dilución de suero analizada. Ratones 1-4: animales inmunizados con eGFP; ratón control: inmunizado con PBS.

Seguidamente, se extrajo el bazo de ambos animales para obtener los linfocitos y estas células se fusionaron con células de mieloma (M&M III. 2. 6. 2). La selección de los hibridomas productores de Ig específicas frente a la eGFP, se llevó a cabo evaluando los sobrenadantes de los cultivos celulares en ELISA indirecto. Finalmente, se obtuvieron cinco líneas celulares positivas: 8D2E3, 5A6D2, 3F7D4, 8G7A7 y 4A2E5. Los hibridomas se propagaron y, a partir del medio de cultivo, se purificaron los anticuerpos por cromatografía de afinidad, empleando una resina

de proteína A/G. El nivel de pureza se analizó en SDS-PAGE, seguido de tinción con Coomassie, observándose un nivel cercano al 100 % para todos los AcM purificados. El isotipo de las Ig purificadas se determinó mediante ELISA indirecto. De forma breve, los AcM purificados se tapizaron a 1,0 ng/µl y las placas se incubaron con las 6 IgG anti-isotipo marcadas (Tabla III.8) diluidas a la 1/4.000, durante 1 h a 37 °C. El revelado se realizó con TMB, durante 10 min. Los 5 anticuerpos monoclonales se clasificaron como IgG1.

IV. 1. 6. 2 Caracterización de los anticuerpos monoclonales

Los AcM obtenidos se caracterizaron mediante ELISA indirecto, *western blot* y ELISA de competición.

En primer lugar, el título de los AcM anti-eGFP se determinó mediante **ELISA indirecto**. Para ello, se utilizó como antígeno 200 ng la proteína GST-eGFP (*E. coli*), puesto que fue la proteína usada como antígeno en los ensayos desarrollados. Los cinco AcM anti-eGFP se utilizaron como anticuerpos primarios en el ensayo y un AcM anti-Fc de ratón-PO, como anticuerpo secundario. Se incluyó como antígeno negativo una proteína no relacionada, expresada, purificada y tapizada de la misma forma que la proteína de interés. Como se observa en la Figura IV.26, cuatro de los cinco AcM presentaron un título de 0,1 ng/µl, mientras que el del AcM 5A6D2, fue 10 veces más bajo que el resto (1 ng/µl).

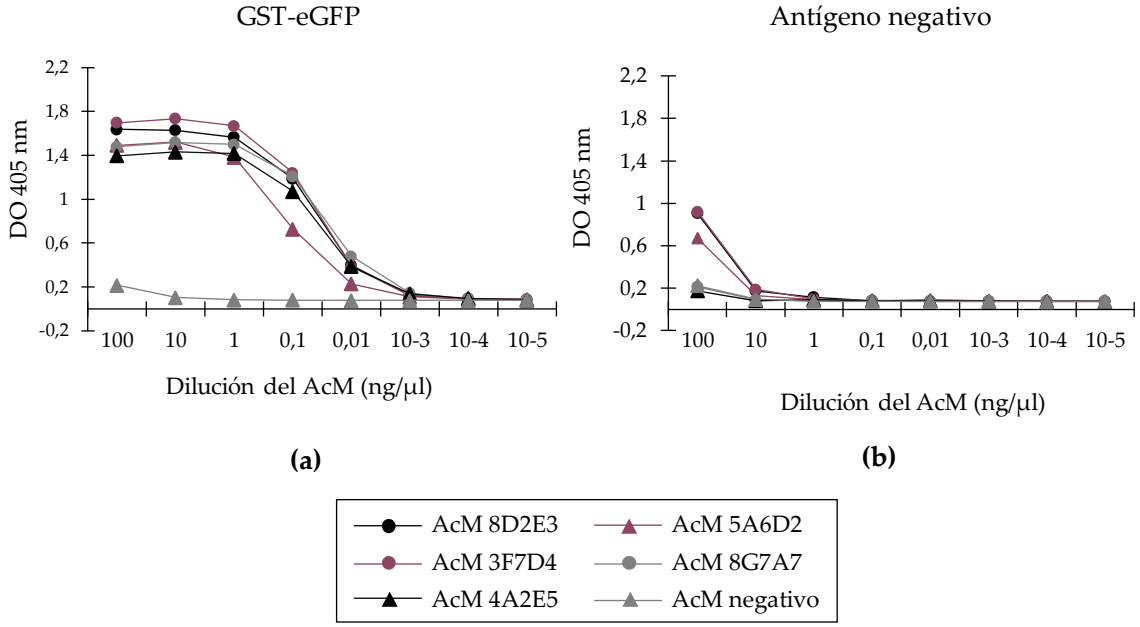


Figura IV.26. Titulación de los anticuerpos monoclonales (AcM) anti-eGFP seleccionados. ELISA indirecto usando como antígeno: **(a)** proteína GST-eGFP; **(b)** antígeno negativo. AcM anti-eGFP: 8D2E3, 3F7D4, 4A2E5, 5A6D2 y 8G7A7.

Respecto a la caracterización mediante ***western blot***, brevemente, se utilizaron 250 ng de la eGFP y el antígeno negativo usado previamente para la titulación mediante ELISA. Tras la incubación de los AcM anti-eGFP, se utilizó como anticuerpo secundario el AcM anti-Fc de ratón-PO. Tres de los cinco AcM obtenidos reconocieron de forma específica a la eGFP, obteniéndose una señal más intensa para el AcM 3F7D4. El reconocimiento fue específico para todos ellos, ya que no se observó señal frente al antígeno negativo. La señal relativa obtenida se indica en la Tabla IV.5.

Tabla IV.5. Caracterización de los cinco anticuerpos monoclonales obtenidos.

AcM	*Western blot*	ELISA de competición				
		8D2E3-PO	5A6D2-PO	3F7D4-PO	8G7A7-PO	4A2E5-PO
8D2E3	–					
5A6D2	+					
3F7D4	+++					
8G7A7	+					
4A2E5	–					

Escala cualitativa de señal: de negativo (-) a positivo de mayor intensidad (+++). La celda en gris indica la competición entre dos AcM. PO: peroxidasa. AcM: anticuerpo monoclonal.

Los epítopos de los AcM también se caracterizaron mediante **ELISA de competición**, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado III. 2. 7. 2. 3 de M&M. Para ello, se tapizaron placas de 96 pocillos con 200 ng de GST-eGFP (*E. coli*). A continuación, los AcM anti-eGFP, sin marcar y conjugados a PO, se incubaron a la vez. En el caso de los anticuerpos sin marcar, se probaron distintas concentraciones mientras que, para los segundos, se utilizó una única dilución establecida como óptima previamente mediante un ELISA directo: 8D2E3-PO y 8G7A7-PO: 1/8.000; 3F7D4-PO y 4A2E5-PO: 1/4.000; 5A6D2-PO: 1/2.000. Como se resume en la Tabla IV.5, se determinó que el epítopo del AcM 8D2E3 no mostraba ningún solapamiento con los otros cuatro AcM, mientras que los AcM 5A6D2 y 3F7D4 mostraron competición entre ellos, al igual que la pareja 8G7A7 y 4A2E5. De este modo, se identificaron al menos tres regiones antigénicas diferentes.

IV. 2. DESARROLLO DE UN ELISA DIVA

En este Capítulo se describe el desarrollo de un inmunoensayo DIVA basado en tres ELISA independientes:

- ELISA indirecto para detección de anticuerpos frente a la proteína pEP153R de genotipo II (**ELISA pEP153R**).
- ELISA indirecto para detección de anticuerpos frente a la proteína marcadora eGFP (**ELISA eGFP**).
- ELISA comercial INgezim® PPA Compac o INgezim® ASFV-R, que detectan anticuerpos frente a algunas de las proteínas más inmunogénicas del vPPA (ensayos control).

La interpretación del ensayo DIVA se indica en la Tabla IV.6

Tabla IV.6. Interpretación del DIVA serológico.

Interpretación	Resultado del ELISA para detectar anticuerpos frente a cada proteína		
	p72 y/o p30	pEP153R	eGFP
Infectado con una cepa del vPPA de genotipo II	**Pos**	**Pos**	Neg
- Infectado con una cepa del vPPA de otro genotipo diferente al II - Tiempo transcurrido entre la seroconversión frente a la p72 y la pEP153R o eGFP	**Pos**	Neg	Neg
Vacunado	**Pos**	Neg	**Pos**
Vacunado e infectado con una cepa del vPPA de genotipo II	**Pos**	**Pos**	**Pos**
No infectado, o en un momento temprano de la infección	Neg	Neg	Neg

Pos: positivo; Neg: negativo.

Una vez el ensayo DIVA fue diseñado y optimizado se realizó una evaluación con un número significativo de sueros procedentes de animales experimentales, así como con muestras alternativas. Además, se llevó a cabo una validación final con muestras procedentes de animales de campo y, por último, su adaptación a un producto comercial. A continuación, se detalla cada una de estas etapas.

IV. 2. 1 Optimización de las condiciones de los ELISA

Las condiciones de los dos ELISA indirectos desarrollados se optimizaron de forma paralela, utilizando como antígenos las proteínas recombinantes pEP153R II-TEV-Fc y GST-eGFP, expresadas en células de mamífero y en células de *E. coli*, respectivamente. Para ello, se analizaron diferentes concentraciones de antígeno tapizado, tipo de placa, así como tiempos, temperaturas de incubación, diluyentes de muestra y sustratos, con el objetivo de que ambos ensayos tuvieran los mismos reactivos y condiciones de incubación, para facilitar su manejo al usuario final.

Brevemente, el primer paso, fue determinar la cantidad de proteína a utilizar. Para ello, se probaron **diferentes concentraciones de antígeno y adherencia de placas**, con el fin de seleccionar las condiciones con las que se obtenía mayor diferencia entre muestras de suero negativas y positivas. En ambos ensayos, se seleccionaron las placas de alta adherencia y, como concentración de tapizado, 0,3 ng/µl para el ELISA pEP153R y 0,05 ng/µl para el ELISA eGFP. El siguiente paso fue la optimización del **diluyente de muestra**. En total, se probaron 3 diluyentes: DE31, DE13 y DE34, ordenados de menor a mayor capacidad bloqueante, determinada por la concentración de sal, suero fetal bovino, BSA, etc. Nuevamente, el objetivo fue obtener la mayor señal diferencial entre muestras de suero negativas y positivas. Para ambos ensayos, el diluyente seleccionado fue el DE34. En la Figura IV.27 se muestran los resultados del ELISA pEP153R, utilizando dos sueros negativos (0 dpi) y dos sueros positivos (21-, 29 dpi), procedentes de dos animales infectados con el virus parental Lv17/WB/Rie1, y los distintos diluyentes de muestra analizados.

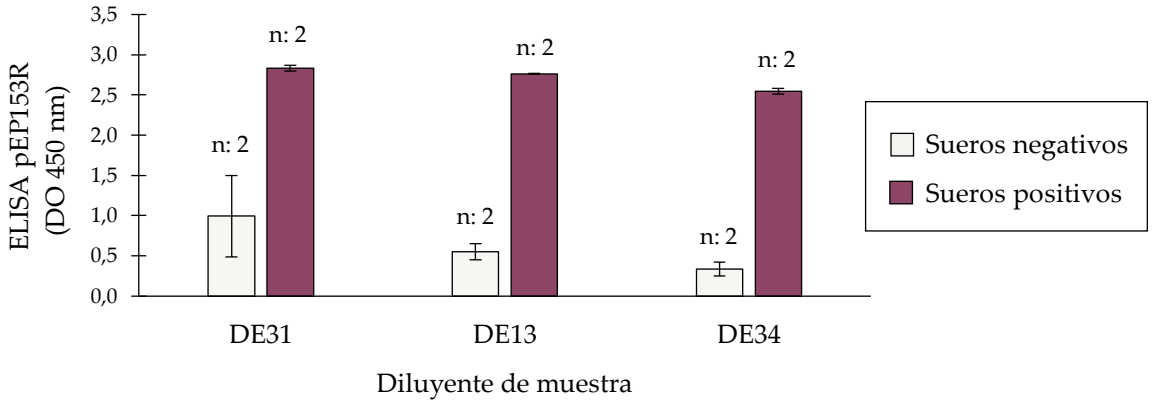


Figura IV.27. Optimización del diluyente de muestra en el ELISA pEP153R. En el eje de ordenadas, se muestra la densidad óptica (DO) a 450 nm obtenida en el ensayo, y en el de abscisas, el diluyente de muestra utilizado (DE31, DE13 y DE34). Las barras representan la media de la DO ± desviación estándar de los sueros analizados.

A continuación, se seleccionó la **biomolécula conjugada** más adecuada para cada uno de los ensayos. En el caso del ELISA pEP153R, se empleó el AcM anti-IgG de cerdo 1BH7-PO y para el ELISA eGFP, se consideró, además, la proteína A/G-PO. Los conjugados se probaron a diferentes diluciones, en distintas soluciones. Los mejores resultados se obtuvieron con el AcM 1BH7-PO, diluido a la 1/40.000 en solución estabilizante de conjugado.

Las **condiciones finales** seleccionadas para ambos ensayos se detallan en la Tabla IV.7.

Tabla IV.7. Condiciones finales seleccionadas para los ELISA indirectos desarrollados.

Parámetro del ELISA		Condición seleccionada
Tapizado	Concentración	pEP153R II-TEV-Fc: 0,3 ng/µl GST-eGFP: 0,05 ng/µl
Muestra de suero	Dilución	1/100 (suero)
	Diluyente	DE34
	Tiempo	1 h
	Temperatura	Ta (20–24 °C)
Conjugado	AcM	1BH7-PO
	Dilución	1/40.000
	Solución	Solución estabilizante de conjugado
	Tiempo	1 h
	Temperatura	Ta (20–24 °C)
Revelado	Sustrato	TMB
	Solución de parada	H_2SO_4
	Tiempo	20 min

IV. 2. 2 Evaluación del ensayo con muestras de suero

La capacidad DIVA de los antígenos pEP53R de genotipo II y eGFP se evaluó con los siguientes **paneles de muestras de suero**:

- Sueros experimentales procedentes de cerdos domésticos infectados con el virus parental (Grupo A1) o vacunados con distintos candidatos vacunales (Grupo A2) (Tabla IV.8).
- Sueros experimentales procedentes de jabalíes infectados (Grupo B1) o vacunados (Grupo B2) (Tabla IV.9).
- Sueros de animales de campo procedentes de áreas libres de PPA.

Analizando en conjunto todas estas muestras, se definió el **punto de corte** para los ensayos mediante el análisis de una curva ROC, según se detalla en el apartado III. 2. 8 de M&M. Para ambos ensayos, el valor p obtenido fue menor que 0,5. Por tanto, los dos ensayos permitieron diferenciar entre muestras positivas y negativas. Además, el diagrama interactivo de puntos del análisis ROC se utilizó para establecer los puntos de corte de los ensayos. Así, teniendo en cuenta los valores de DO de la muestra (M) y del control negativo (CN), se estableció como punto de corte un valor M-CN mayor que 0,5 para el ELISA pEP153R, y superior a 0,6 para el ELISA eGFP (Figura IV.28).

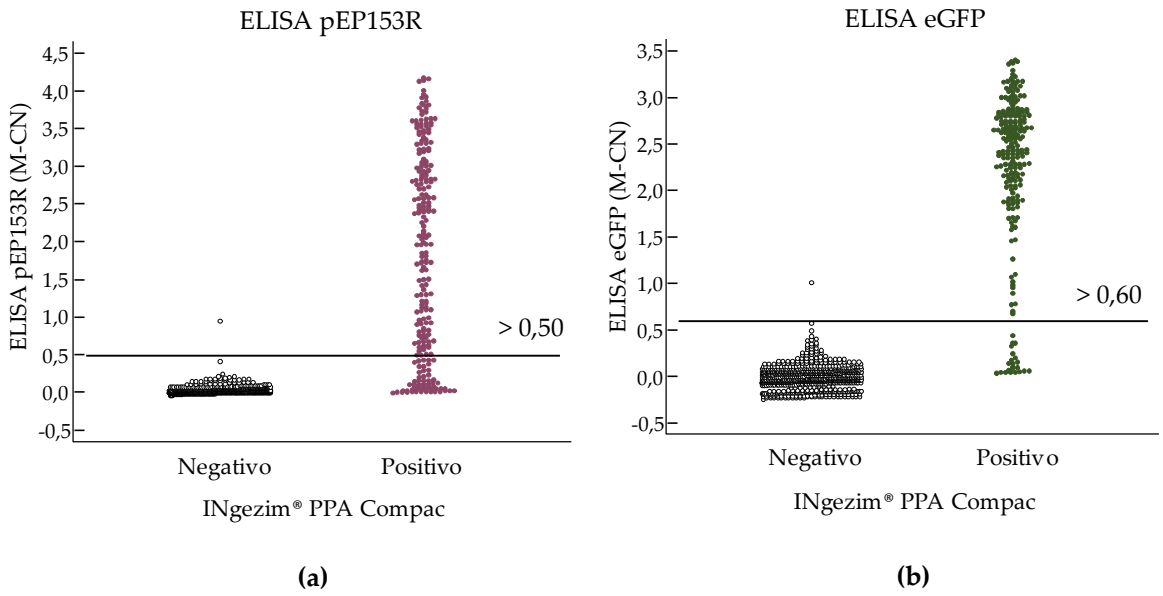


Figura IV.28. Diagrama interactivo de puntos (análisis ROC) para los ELISA desarrollados. (a) ELISA pEP153R; **(b)** ELISA eGFP. La línea horizontal indica el punto de corte para cada ensayo (M-CN > 0,50 y M-CN > 0,60, respectivamente). M-CN: DO de la muestra menos DO del control negativo del ensayo.

A continuación, se describe el análisis del ELISA DIVA con cada uno de los **grupos de muestras utilizadas**.

IV. 2. 2. 1 Sueros procedentes de cerdos domésticos experimentales

En la evaluación del ensayo DIVA con muestras experimentales procedentes de cerdos domésticos, se incluyeron 115 sueros de 7 animales infectados con el virus parental (Grupo A1) y 198 sueros de 16 animales vacunados con diferentes prototipos, donde el gen EP153R fue sustituido por el gen reportero eGFP (Grupo

A2). En la Tabla IV.8 se resumen las muestras analizadas, agrupadas según su día de recogida (dpi/dpv).

Tabla IV.8. Sueros procedentes de cerdos domésticos infectados (Grupo A1) o vacunados (Grupo A2) experimentalmente.

Cerdos domésticos		**Grupo A1*:** Lv17/WB/Rie1				**Grupo A2*:** Lv17/WB/Rie1-Δ153, Lv17/WB/Rie1-Δ153-Δ402 o Lv17/WB/Rie1--Δ153-Δ402-ΔUK			
dpi/dpv		**[0-10)**	**[10-20)**	**[20-30)**	**≥ 30**	**[0-10)**	**[10-20)**	**[20-30)**	**≥ 30**
No. de animales		7	7	5	5	16	16	14	14
No. de muestras		16	12	12	75	44	28	32	94
INgezim® PPA Compac	*No. de negativos*	16	2	0	0	43	9	3	0
	No. de positivos	0	10	12	75	1	19	29	94

*Las características de las inmunizaciones de estos animales, se describen en el apartado de M&M III. 1. 8. 1. 1 (Tabla III.11).

Como se observa en la Figura IV.29.a, el 100 % de los **animales infectados** con el virus parental desarrollaron anticuerpos frente a la p72 a los 14 ± 2 dpi, y el 86 % seroconvirtió a la pEP153R a los 25 ± 5 dpi. El único animal que no desarrolló una respuesta serológica frente a la pEP153R murió a los 12 dpi. Dos de los 7 animales del Grupo A1, no se expusieron a la cepa virulenta de genotipo II del vPPA (Arm07) hasta los 58 dpi. Sin embargo, su título de anticuerpos frente a la pEP153R se mantuvo positivo y no varió hasta entonces (datos no mostrados). Todos los cerdos domésticos infectados con el virus parental fueron negativos en el ELISA eGFP.

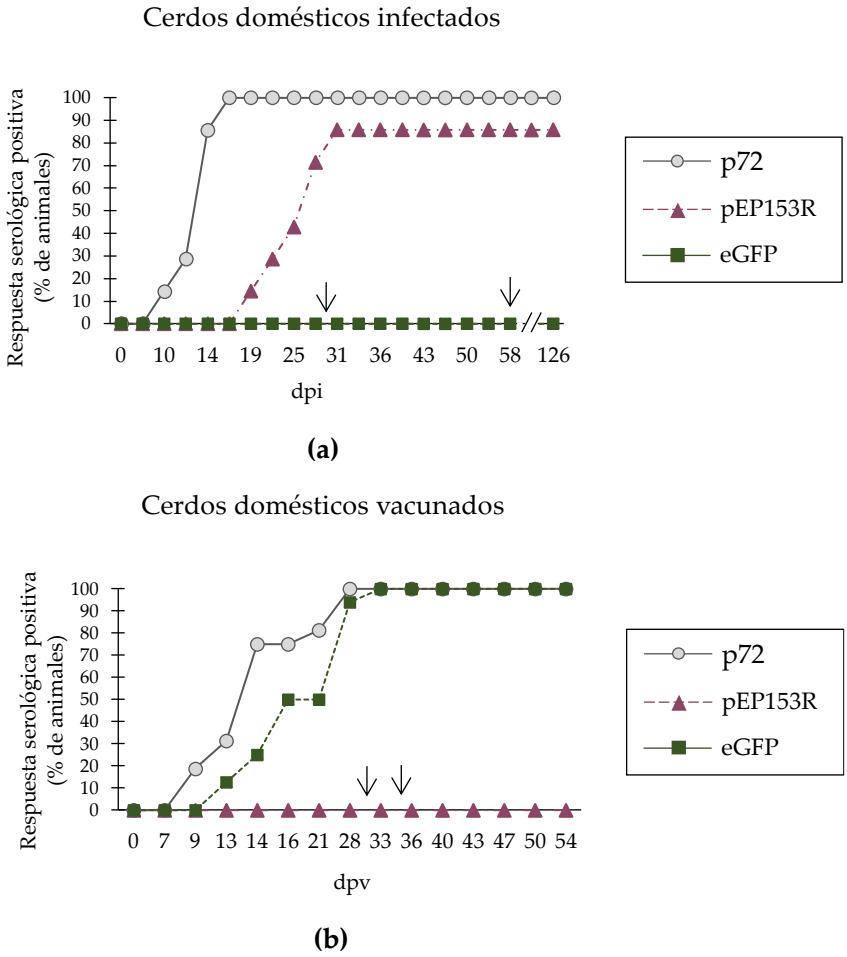


Figura IV.29. Respuesta serológica de cerdos domésticos experimentales. (a) Infectados; **(b)** vacunados. En cada caso, el eje de ordenadas muestra el porcentaje de animales positivos en el ELISA INgezim® PPA Compac (p72), ELISA pEP153R (pEP153R) y ELISA eGFP (eGFP), y el eje de abscisas, los distintos días posinfección (dpi) o posvacunación (dpv). Las flechas indican el momento del desafío con la cepa Arm07.

Respecto a los **cerdos domésticos vacunados** (Figura IV.29.b), el 100 % de los animales seroconvirtieron frente a la p72 a los 15 ± 4 dpv y frente a la eGFP a los 18 ± 4 dpv, mientras que no desarrollaron anticuerpos frente a la pEP153R, incluso después del desafío con el virus Arm07, hasta los 54 dpv.

En la Figura IV.30, se muestran los **datos cuantitativos obtenidos en el ensayo DIVA**, agrupando las muestras de los animales infectados o vacunados, por dpi o dpv, respectivamente. De este modo, se detectó una sensibilidad del ELISA pEP153R del 10,0 % [IC 95 %: 1,7–44,5 %] para las muestras recogidas antes de los 20 dpi, incrementando al 50,0 % [IC 95 %: 21,2–78,8 %] en los siguientes 10 días, y finalmente alcanzando un valor del 100,0 % [IC 95 %: 95,2–100, 0 %] para muestras

recogidas a más de 30 dpi. Analizando los mismos intervalos de tiempo en animales vacunados, con el ELISA eGFP se observó una sensibilidad del 58,3 % [IC 95 %: 36,7–77,9 %], 96,9 % [IC 95%: 83,7–99,5 %] y 100,0 % [IC 95 %: 96,4–100,0 %], respectivamente. La especificidad analítica de ambos ELISA fue del 100,0 % [IC 95 % ELISA pEP153R: 98,4 –100,0 %; IC 95 % ELISA eGFP: 97,7–100,0 %], considerando todas las muestras analizadas.

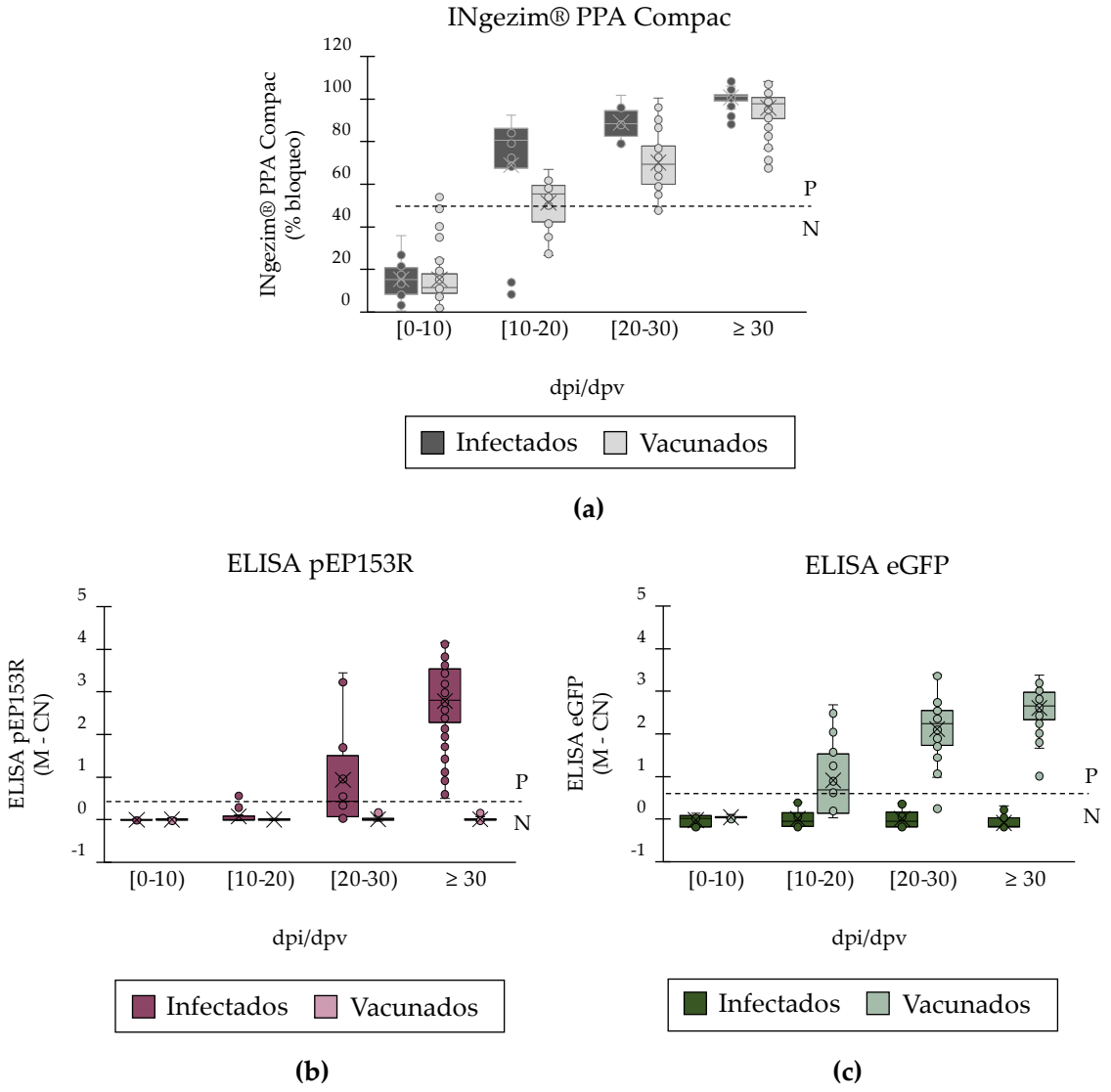


Figura IV.30. Datos del ELISA DIVA en muestras de cerdos domésticos experimentales. **(a)** ELISA control (INgezim® PPA Compac); **(b)** ELISA pEP153R; **(c)** ELISA eGFP. En cada caso, en el eje de ordenadas, se representan los datos en porcentaje de bloqueo o M–CN, y en el eje de abscisas, las muestras agrupadas por día de recogida (días posinfección, dpi, o posvacunación, dpv). El punto de corte de cada ensayo se indica con una línea horizontal (P: positivo; N: negativo).

IV. 2. 2. 2 Sueros procedentes de jabalíes experimentales

Para la evaluación del ensayo DIVA con muestras experimentales procedentes de jabalíes, se analizaron 87 muestras de animales infectados (Grupo A1) y 96 muestras de jabalíes vacunados (Grupo B1). En la Tabla IV.9 se muestran las muestras analizadas, clasificadas según su día de recogida (dpi/dpv).

Tabla IV.9. Sueros procedentes de jabalíes infectados (Grupo B1) o vacunados (Grupo B2) experimentalmente.

Jabalíes		**Grupo B1:** Lv17/WB/Rie1					**Grupo B2:** Lv17/WB/Rie1-Δ153-Δ402				
dpi/dpv		**[0-10)**	**[10-20)**	**[20-30)**	**[30-40)**	**≥ 40**	**[0-10)**	**[10-20)**	**[20-30)**	**[30-40)**	**≥ 40**
No. de animales		7	8	8	7	8	8	8	7	7	8
No. de muestras		13	15	9	14	36	20	19	19	10	28
INgezim® PPA Compac	*No. de negativos*	13	9	3	3	0	19	8	9	2	0
	No. de positivos	0	6	6	11	36	1	11	10	8	28

*Las características de las inmunizaciones de estos animales, se describen en el apartado de M&M III. 1. 8. 1. 1 (Tabla III.11).

Como se observa en Figura IV.31.a, el 100 % de los **animales inmunizados con el virus parental Lv17/WB/Rie1** desarrollaron una respuesta de anticuerpos frente a la pEP153R a partir de diferentes tiempos desde los 25 dpi, mientras que se mantuvieron negativos frente a la eGFP. Por el contrario, todos los **jabalíes vacunados** con el candidato vacunal Lv17/WB/Rie1-Δ153-Δ402 seroconvirtieron frente a la proteína eGFP a distintos momentos a partir de los 16 dpv y permanecieron negativos frente a la pEP153R, incluso después del desafío con el vPPA Arm07 (Figura IV.31.b). Todos los animales analizados fueron positivos frente a la proteína control p72, indicando que se habían inmunizado frente al virus o vacuna administrada.

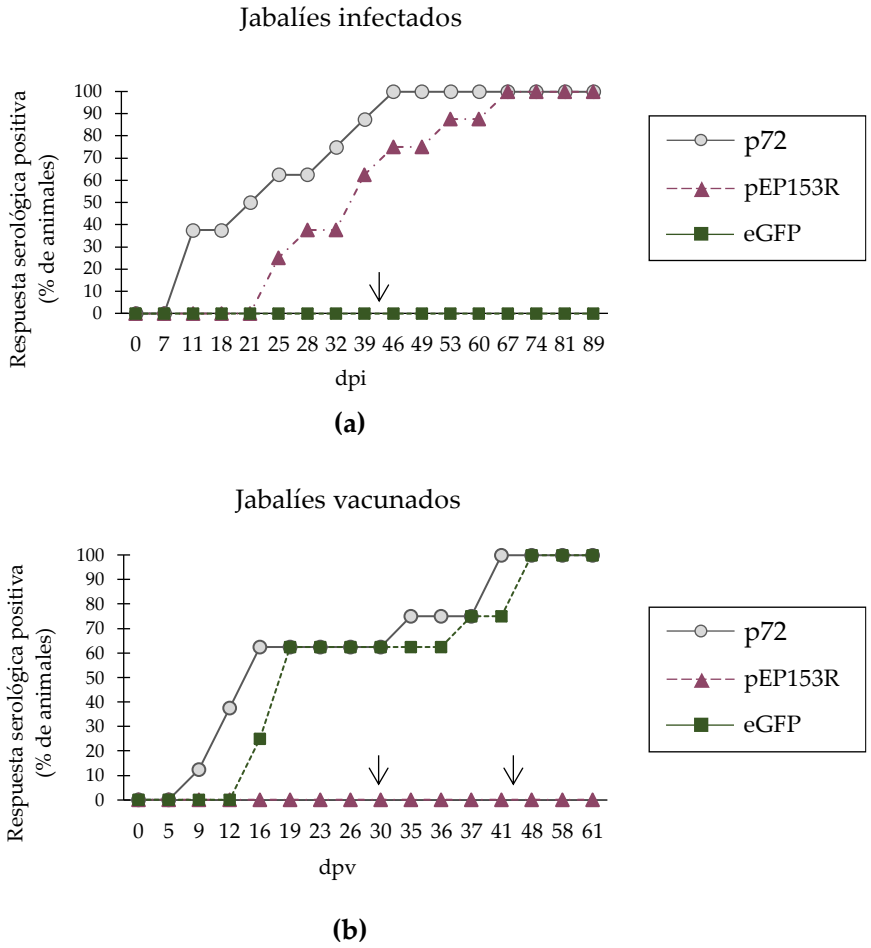


Figura IV.31. Respuesta serológica de jabalíes experimentales. (a) Infectados; **(b)** vacunados. En cada caso, el eje de ordenadas muestra el porcentaje de animales positivos en el ELISA INgezim® PPA Compac (p72), ELISA pEP153R (pEP153R) y ELISA eGFP (eGFP), y el eje de abscisas, los distintos días posinfección (dpi) o posvacunación (dpv). Las flechas indican el momento del desafío con la cepa Arm07.

Por último, en la Figura IV.32, se muestran los **datos cuantitativos** de todas las muestras analizadas con los tres ELISA, agrupados por dpi o dpv. Respecto al ELISA pEP153R, no se detectaron anticuerpos frente a esta proteína [IC 95 %: 0,0–41,1 %] para muestras recogidas antes de los 20 dpi, mientras que la sensibilidad del ensayo incrementó al 20,0 % [IC 95 %: 3,3–71,2 %] para los siguientes 10 días y hasta el 54,6 % [IC 95 %: 23,5–83,1 %] para el intervalo de tiempo [30-40) dpi. La sensibilidad alcanzó un 87,9 % [IC 95 %: 71,8–96,5 %] para muestras recogidas después de los 40 dpi. Por otro lado, considerando las muestras de animales vacunados, la sensibilidad del ELISA eGFP fue del 50,0 % [IC 95 %: 21,2–78,8 %], 100,0 % [IC 95 %: 69,0–100,0 %], 87,5 % [IC 95 %: 47,4–97,9 %], y 92,9 % [IC 95 %: 76,5–98,9 %], para los mismos intervalos de tiempo. La especificidad de ambos

ensayos fue del 100,0 % [IC 95 % ELISA pEP153R: 97,0–100,0 %; IC 95 % ELISA eGFP: 96,9–100,0 %], considerando todas las muestras analizadas.

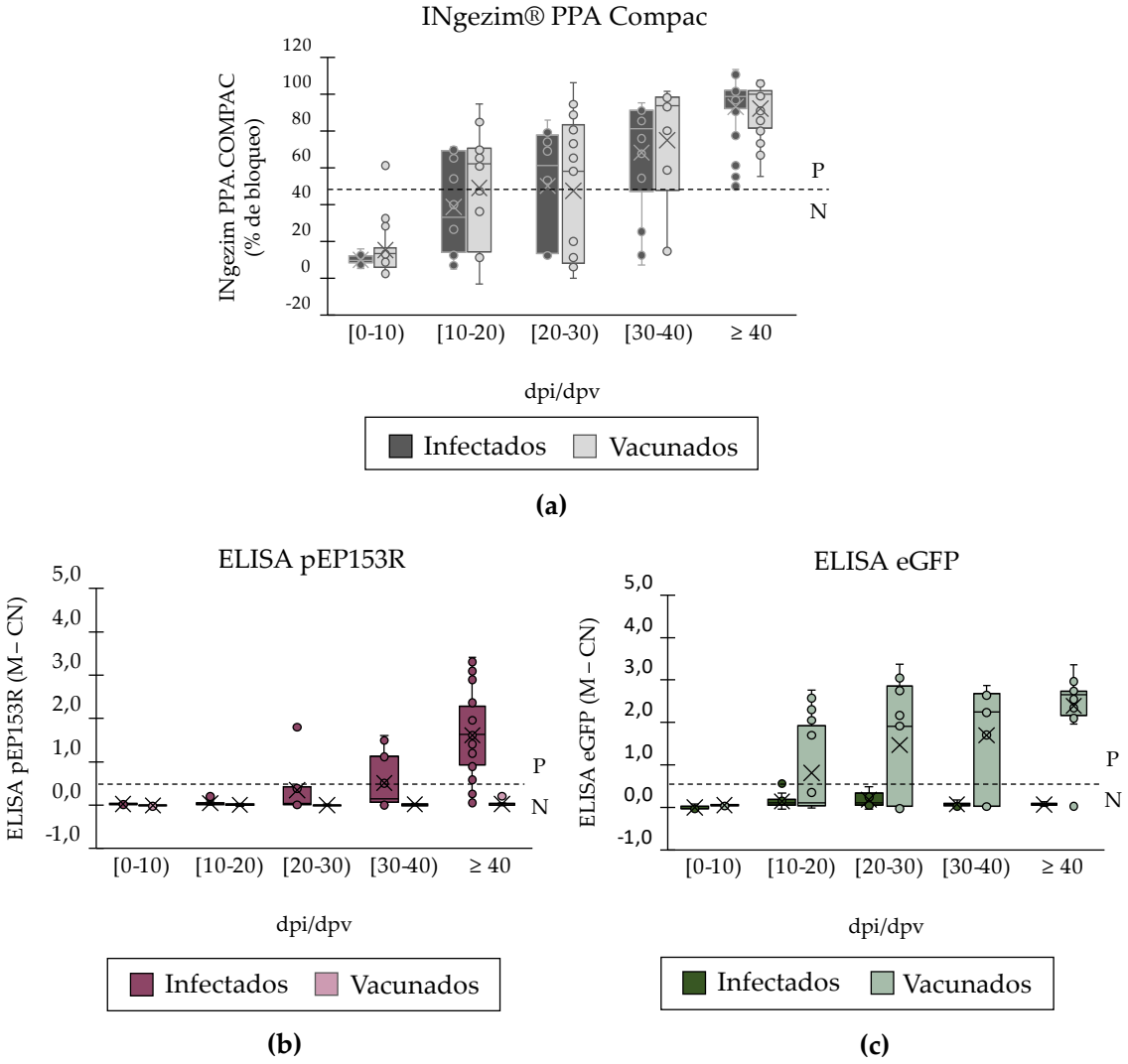


Figura IV.32. Datos del ELISA DIVA en muestras de jabalíes experimentales. (a) ELISA control (INgezim® PPA Compac); **(b)** ELISA pEP153R; **(c)** ELISA eGFP. En cada caso, en el eje de ordenadas, se representan los datos en porcentaje de bloqueo o M–CN, y en el eje de abscisas, las muestras agrupadas por día de recogida (días posinfección, dpi, o posvacunación, dpv). El punto de corte de cada ensayo se indica con una línea horizontal (P: positivo; N: negativo).

IV. 2. 2. 3 Sueros procedentes de animales negativos a PPA

La especificidad diagnóstica de los nuevos ensayos desarrollados se analizó con un total de 384 sueros negativos de campo procedentes de áreas libres de PPA: 150 sueros de cerdos y 234 sueros de jabalíes. De estos sueros, 161 eran positivos a

tuberculosis porcina y otros 20 positivos a Mal Rojo y Aujeszky. Además, se incluyeron 16 sueros de cerdos experimentales positivos a PPC, para descartar la posibilidad de reactividad cruzada entre ambas patologías. Para ambos ELISA, la especificidad fue del 100 % [IC 95 %: 97,8–100,0 %] y 99,6 % [IC 95 %: 97,6–99,9 %] en cerdos y jabalíes, respectivamente.

Considerando en conjunto todas las muestras de suero analizadas en este apartado, se observó una sensibilidad del ELISA pEP153R, con muestras positivas experimentales, del 75,3 % [IC 95 %: 69,3–80,7 %] y una especificidad del 99,9 % [IC 95 %: 99,3–100,0 %]. Por otro lado, la sensibilidad del ELISA eGFP fue del 90,0 % [IC 95 %: 85,2–93,6 %] y la especificidad del 99,9 % [IC 95 %: 99,3–100,0 %]. Además, al comparar la sensibilidad obtenida en cerdos domésticos y jabalíes, el ELISA eGFP no mostró diferencias significativas entre ambos animales [IC 95 %, valor $p > 0,05$], mientras que sí se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la sensibilidad del ELISA pEP153R, para muestras recogidas a más de 30 dpi [IC 95 %, valor $p < 0,05$].

IV. 2. 3 Evaluación del ensayo con muestras alternativas

El ELISA DIVA desarrollado se adaptó para ser utilizado con muestras alternativas (sangres y tejidos) procedentes de animales experimentales y animales de campo no infectados. El ensayo comercial INgezim® ASFV-R se utilizó como referencia.

IV. 2. 3. 1 Muestras de sangre

Se analizaron muestras de sangre líquidas y recogidas en papel de filtro, siguiendo el protocolo indicado previamente en la Tabla IV.7, y optimizando la dilución de la muestra. Los resultados con estos tipos de muestra se compararon con los obtenidos con las muestras de sueros pareadas, es decir, procedentes del mismo animal y recogidas en el mismo momento.

- **Muestras de sangre líquida:**

En primer lugar, se optimizó la dilución de la muestra, seleccionando la misma que para las muestras de suero (1/100). A continuación, se analizaron 250 muestras

de sangres negativas procedentes de **cerdos de campo de zonas libres de PPA**. El ELISA eGFP mostró una especificidad diagnóstica del 100,0 % [IC 95 %: 98,5–100,0 %], mientras que se detectó un falso positivo para el ensayo de la pEP153R, resultando en una **especificidad diagnóstica** del 99,6 % [IC 95 %: 97,6–100,0 %].

Por otro lado, se analizaron muestras procedentes de **animales experimentales** infectados o vacunados, recogidas a distintos días. Estas muestras se describen en el apartado III. 1. 8. 1. 2 y se clasifican en la Tabla IV.10, según los resultados obtenidos en los ELISA indirectos desarrollados, con sus muestras pareadas de sueros.

Tabla IV.10. Resultados de las muestras de suero en el ELISA pEP153R y el ELISA eGFP, consideradas en el análisis comparativo con sangres pareadas.

Sueros	Negativos	Positivos Débiles	Fuertes
	≤ punto de corte	(punto de corte–0,9]	> 0,9
ELISA pEP153R	44	17	26
ELISA eGFP	69	1	17

Puntos de corte: ELISA pEP153R: 0,5; ELISA eGFP: 0,6.

En las muestras de sangre experimentales, ambos ensayos revelaron una **especificidad analítica** del 100,0 % [IC 95 % ELISA pEP153R: 91,8–100,0 %; IC 95 % ELISA eGFP: 94,8–100,0 %]. Respecto a la **sensibilidad**, las muestras positivas cercanas al punto de corte (positivas débiles) se analizaron de manera independiente al resto de muestras positivas. Así, el ELISA pEP153R solo detectó 3 sangres pareadas de las 17 muestras de suero positivas débiles (17,6 % [IC 95 %: 4,0–43,5 %]), mientras que ninguna fue detectada en el ELISA eGFP (0,0 % [IC 95 %: 0,0–83,3 %]). Por otro lado, se alcanzó en el resto de las muestras positivas, una sensibilidad analítica del 100,0 % en ambos ensayos [IC 95 % ELISA pEP153R: 86,7–100,0 %; IC 95 % ELISA eGFP: 80,3–100,0 %].

- **Muestras de sangre recogidas en papel de filtro:**

En este caso, la dilución de muestra seleccionada fue de 1/2. Así, de las 250 sangres líquidas procedentes de animales de campo analizadas en el apartado previo, 150 se secaron sobre papel de filtro, siguiendo el procedimiento descrito en III. 2. 7. 2. 1 de M&M. Con estas muestras, la **especificidad diagnóstica** observada fue del 100,0 % [IC 95 %: 97,6–100,0 %] para ambos ensayos.

Posteriormente, se evaluó la sensibilidad y especificidad con **muestras experimentales**, procedentes de animales infectados y vacunados (Tabla IV.11). Así, se observó de igual forma un 100 % [IC 95 % $_{\text{ELISA pEP153R}}$: 76,7–100,0 %; IC 95 % $_{\text{ELISA eGFP}}$: 94,2–100,0 %] de **especificidad analítica** para ambos ensayos con estas muestras.

Tabla IV.11. Resultados de las muestras de suero en el ELISA pEP153R y ELISA eGFP, consideradas en el análisis comparativo con sangres recogidas en papel de filtro.

Sueros	Negativos	Positivos	
		Débiles	Fuertes
	≤ punto de corte	(punto de corte–0,9]	> 0,9
ELISA pEP153R	14	0	52*
ELISA eGFP	62	0	4**

*procedentes de dos cerdos domésticos infectados con Lv17/WB/Rie14/Tukuma5 (Grupo C, Tabla III.11). **: procedentes de dos cerdos domésticos vacunados con Lv17/WB/Rie1-ΔMGF (Grupo A.3, Tabla III.11). Puntos de corte: ELISA pEP153R: 0,5; ELISA eGFP: 0,6.

En cuanto a la **sensibilidad analítica**, el ELISA pEP153R detectó 7 muestras positivas más en las sangres recogidas en papel de filtro, respecto a los sueros pareados. De este modo, se alcanzó un valor de sensibilidad en el primer tipo de muestra 82,7 % [IC 95 %: 69,7–91,8 %], mientras que, en los sueros, la sensibilidad fue del 69,2 % [IC 95 %: 54,9–81,3 %], respecto al ensayo control. No obstante, esta diferencia no fue estadísticamente significativa [IC 95 %; valor p > 0,05]. Por otro lado, en el caso del ELISA eGFP, solo se detectó un 50,0 % [IC 95 %: 8,3–91,7 %] de las muestras de sueros positivas pareadas.

IV. 2. 3. 2 Muestras de tejidos

Para este análisis se emplearon las muestras de exudado y homogeneizado de tejidos, procedentes de animales vacunados (Lv17/WB/Rie1-Δ153-Δ402) o infectados (Pol18/WB/Case1794 o Lv17/WB/Rie1) experimentalmente (Tabla III.12), así como 11 muestras de exudado de tejidos negativas procedentes de 5 jabalíes y 6 cerdos doméstico de campo no infectados (M&M III. 1. 8. 2. 1). Las condiciones de los ELISA fueron las mismas que las utilizadas para las muestras de sueros (Tabla IV.7), a excepción de la dilución de muestra, que se optimizó a 1/100 para las muestras de exudado y 1/5 para los homogeneizados de médula ósea (datos no mostrados).

Con estas condiciones, el análisis de las **muestras negativas** de los animales de campo, así como de los experimentales cuyos sueros pareados habían dado un resultado negativo en ambos ELISA, resultó en un valor de **especificidad** del 100,0 % para ambos ensayos [IC 95 %: 91,7–100,0 %].

Respecto a las **muestras positivas**, los resultados se muestran en la Tabla IV.12. Todas las muestras de tejidos procedentes de **animales infectados** fueron positivas en el ELISA pEP153R, a excepción de 1 muestra de diafragma, y negativas en el ELISA eGFP. Por otro lado, las muestras de tejidos procedentes de **animales vacunados** mostraron una concordancia perfecta con las muestras pareadas de suero en el ELISA eGFP. Asimismo, las muestras positivas en el ELISA pEP153R (n: 5) procedían de 2 animales cuyos sueros también habían sido positivos. Por tanto, los resultados mostraron que el ensayo puede ser utilizado con muestras de tejido, teniendo mayor sensibilidad en muestras de pulmón, hígado y médula ósea.

Tabla IV.12. Resultados en el ELISA pEP153R y eGFP con muestras de tejidos procedentes de los animales cuyos sueros pareados fueron positivos en el ELISA correspondiente.

Condición del animal	Órgano	No. de muestras positivas: Tejido/sueros pareados	
	Tipo	ELISA pEP153R	ELISA eGFP
Infectados con aislados del vPPA de genotipo II (n: 33)	Pulmón	7/7	0/0
	Corazón	5/5	0/0
	Riñón	3/3	0/0
	Hígado	4/4	0/0
	Diafragma	6/7	0/0
	Médula ósea	7/7	0/0
	Total	**32/33**	**0/0**
Vacunados y desafiados (n: 25)	Pulmón	2/2	5/5
	Bazo	0/2	5/5
	Riñón	0/1	1/1
	Hígado	1/1	4/4
	Diafragma	0/2	5/5
	Médula ósea	2/2	5/5
	Total	**5/10**	**25/25**

No.: número; n: no. total de muestras analizadas (negativas + positivas).

IV. 2. 4 Validación del ensayo con muestras procedentes de animales de campo

Para la validación final de los ELISA desarrollados, se utilizaron **muestras procedentes de animales de campo, de países europeos donde el vPPA ha circulado en la última década** (Tabla III.13). Puesto que, a día de hoy, no se está administrando en Europa ninguna vacuna, en el caso del ELISA eGFP, solo fue posible estudiar su especificidad. En el análisis, se incluyó la detección de anticuerpos frente a la p72 (INgezim® PPA Compac) o p30/pCP312R (INgezim® ASFV-R), según el tipo de muestras, como control. Los resultados obtenidos con estos ensayos comerciales se resumen en la Tabla IV.13 por tipo de muestra analizada.

Tabla IV.13. Muestras analizadas procedentes de animales de campo.

Tipo de muestra	Muestras de cerdos			Muestras de Jabalíes		
	Negativas	Positivas	Total	Negativas	Positivas	Total
Suero	191	40(23)	231(23)	341	219(23)	560(23)
Sangre	66	6	72	369	408	777
Exudado de tejido	291	27	318	11	3	14
Homogeneizado de tejidos	58	1	59	148	14	162
Médula ósea	0	0	0	144	16	160
Total	**606**	**74(23)**	**680(23)**	**1013**	**660(23)**	**1673(23)**

Entre paréntesis se indican las muestras positivas procedentes de Cerdeña (n: 46).

En primer lugar, se analizó la especificidad diagnóstica del **ELISA eGFP**. Como se observa en la Figura IV.33.a, de las 2353 muestras analizadas, solo 3 fueron falsos positivos, obteniéndose una especificidad del 99,9 % [IC 95 %: 99,6–100,0 %], sin detectarse diferencias estadísticamente significativas entre cerdos y jabalíes.

Seguidamente, se analizaron los datos obtenidos con el **ELISA pEP153R** para el cálculo de los parámetros diagnósticos del ensayo. Como muestra la Figura IV.33.b, la especificidad global fue del 98,7 % [IC 95 %: 98,0–99,2 %] y no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre cerdos y jabalíes. Sin embargo, sí se detectaron diferencias significativas en el parámetro de sensibilidad entre ambos animales, ya que se obtuvo un valor del 7,8 % [IC 95 %: 2,2–18,9 %] y

del 46,5 % [IC 95 %: 42,5–50,4 %], respectivamente. Debido a estas diferencias entre animales, los siguientes análisis se realizaron agrupando las muestras por tipo de animal.

Por otro lado, las muestras positivas en el ensayo INgezim® PPA Compac procedentes del laboratorio IZS (Cerdeña) no se consideraron en el cálculo de la sensibilidad del ELISA pEP153R. Esto fue debido a que estaban caracterizadas como infecciones con vPPA de genotipo I. Para estas muestras (n: 46), la especificidad fue del 100,0 % [IC 95 %: 92,2–100,0 %].

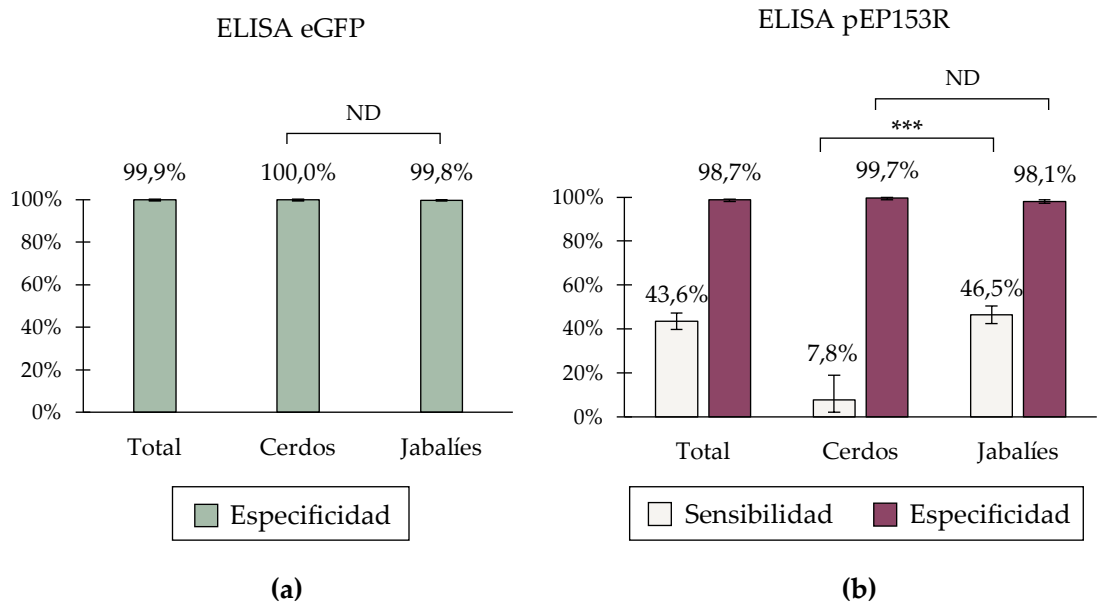


Figura IV.33. Análisis de la sensibilidad y/o especificidad diagnóstica de los ensayos. (a) ELISA eGFP; **(b)** ELISA pEP153R. En el eje de ordenadas, se representa el porcentaje de sensibilidad o especificidad (intervalo de confianza, IC: 95 %) y, en el eje de abscisas, se clasifican las muestras por animal. Valor de significancia estadística: prueba de chi cuadrado (IC: 95 %), ND: sin diferencias, ***: $p < 0,001$.

IV. 2. 4. 1 Muestras procedentes de jabalíes de campo

Al analizar la **sensibilidad diagnóstica del ELISA pEP153R por tipo de matriz** (Figura IV.34), se observó que el mayor porcentaje de muestras positivas detectadas se obtuvo con muestras de suero (54,6 % [IC 95 %: 47,3–61,7 %]) y sangre (45,8 % [IC 95 %: 40,9–50,8 %]), sin observarse diferencias estadísticamente significativas entre ambas. Sin embargo, comparando con las muestras de suero, sí se observaron diferencias en el número de positivos detectados en muestras de

exudado, médula ósea y homogeneizado de tejidos, siendo únicamente estadísticamente significativas para los dos últimos.

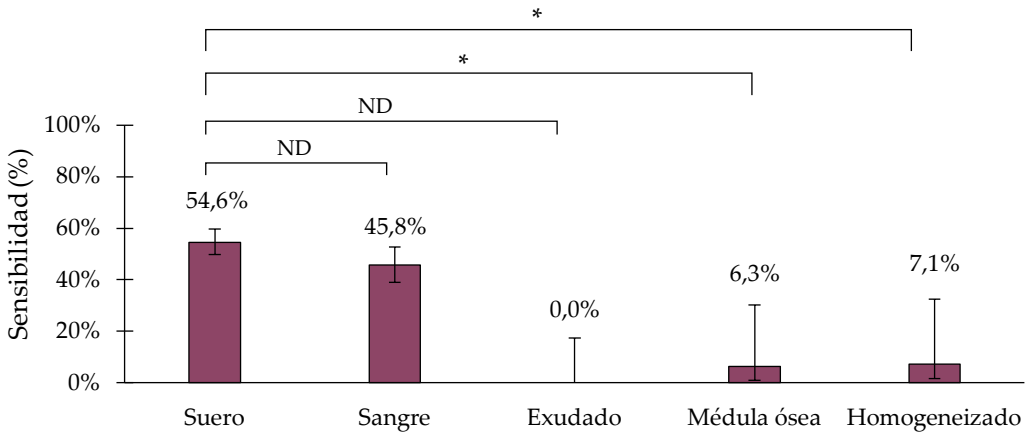


Figura IV.34. Sensibilidad diagnóstica del ELISA pEP153R en muestras procedentes de jabalíes de campo. En el eje de ordenadas, se representa la sensibilidad y, en el de abscisas, el tipo de muestra. Valor de significancia estadística: prueba de chi cuadrado (intervalo de confianza: 95 %), ND: sin diferencias, *: $p < 0,05$. n: número de muestras.

A continuación, se analizó la sensibilidad del ELISA pEP153R, agrupando las **muestras de suero y sangre según su título de IPT**. Como muestra la Figura IV.35, se observó una tendencia de aumento de la sensibilidad, a medida que aumentaba también el título de IPT de la muestra. En prácticamente todos los grupos, se observó una diferencia estadísticamente significativa en la sensibilidad del ELISA pEP153R respecto al ELISA control (INgezim® PPA Compac o INgezim® ASFV-R), a excepción del grupo de sueros con mayor título de IPT (> 10.240) en donde la sensibilidad del ELISA desarrollado (82,1 % [IC 95 %: 86,5–92,4 %]) no fue estadísticamente diferente a la observada para el ensayo INgezim® PPA Compac. Por otro lado, se observó que dicha sensibilidad fue estadísticamente mayor a la observada en muestras de sangre (51,1 % [IC 95 %: 40,4–61,7 %]), para el mismo grupo de muestras (IPT > 10.240).

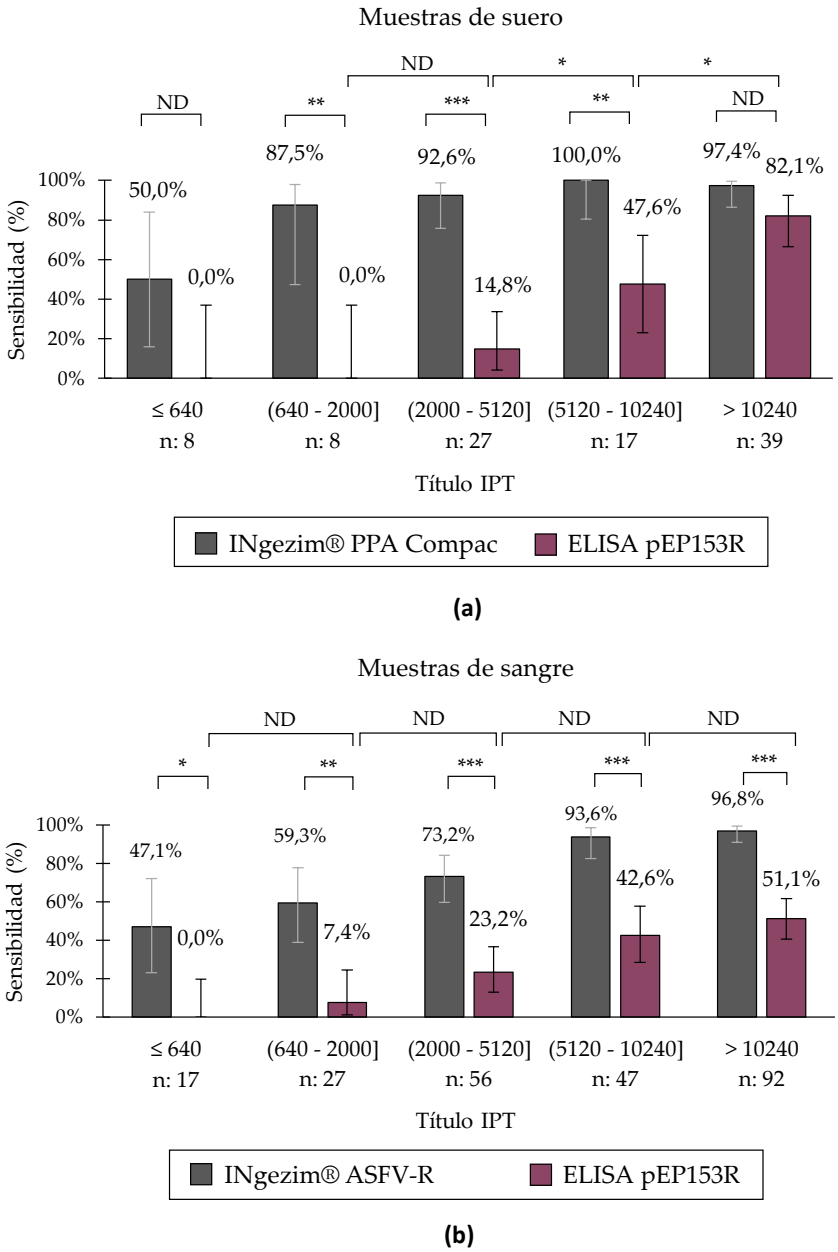


Figura IV.35. Sensibilidad del ELISA pEP153R en muestras de jabalíes de campo, positivas a anticuerpos en IPT (ensayo de referencia). (a) Muestras de suero; **(b)** muestras de sangre. En cada caso, el eje de ordenadas muestra la sensibilidad obtenida en los ensayos, y el eje de abscisas las muestras agrupadas por título de IPT. Valor de significancia estadística: prueba de chi cuadrado (intervalo de confianza: 95 %), ND: sin diferencias, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

Teniendo en cuenta que algunas de las **sangres positivas a anticuerpos frente al vPPA (INgezim® ASFV-R)** estaban también caracterizadas en la qPCR de rutina, que detecta el gen viral B646L (n: 331), se analizó la sensibilidad del ELISA pEP153R clasificando las muestras por su valor del ciclo umbral (Ct). Como muestra la Figura IV.36, en muestras positivas en qPCR, la sensibilidad del ELISA pEP153R

incrementó a medida que lo hacía el valor de Ct. Para las muestras negativas mediante qPCR, se observó una sensibilidad del ensayo estadísticamente menor, respecto a los dos grupos anteriores.

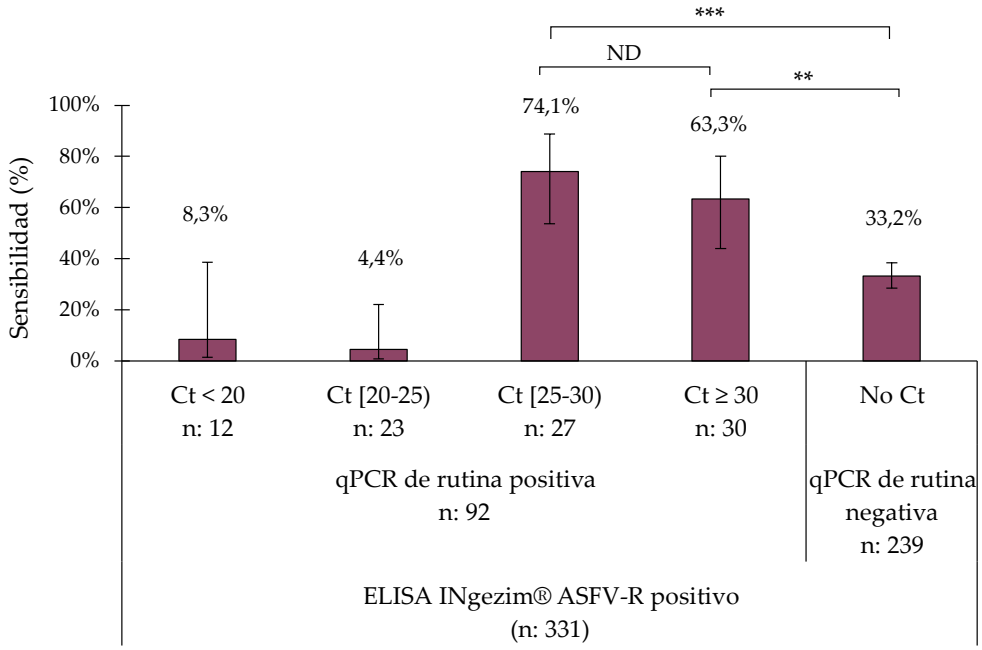


Figura IV.36. Sensibilidad del ELISA pEP153R en muestras procedentes de jabalíes, positivas en el ELISA control INgezim® ASFV-R. El eje de ordenadas muestra la sensibilidad, y el de abscisas, las muestras agrupadas por el valor de Ct en la qPCR de rutina. Valor de significancia estadística: prueba de chi cuadrado (intervalo de confianza: 95 %), ND: sin diferencias, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

Adicionalmente, se realizó un **análisis conjunto de todas las muestras positivas a PPA que habían sido caracterizadas por el ensayo DIVA serológico y la qPCR de rutina** (n: 832). En la Figura.IV.37, se muestran los resultados obtenidos en el ELISA control, el ELISA pEP153R y la qPCR de rutina. Los resultados del ELISA eGFP no se incluyen en dicha figura, ya que todas las muestras analizadas, al proceder de animales infectados, fueron negativas.

Este último análisis permitió identificar 5 grupos de muestras. Del total de las muestras, el 67,9 % del total [IC 95 %: 64,6–71,1 %] fue positivo a anticuerpos frente a la proteína control, mientras que el 30,5 % también resultó positivo a anticuerpos frente a la pEP153R. Cabe destacar los resultados del **grupo 5**, en el que las muestras fueron positivas en el ensayo control, INgezim® PPA Compac/INgezim® ASFV-R, y negativas en el ELISA pEP153R y la qPCR de rutina. Debido a estos resultados, no sería posible obtener un diagnóstico DIVA preciso en este grupo, que representa el **24,4 %** [IC 95 %: 21,5–27,5 %] (n: 203) del total de muestras analizadas (n: 832).

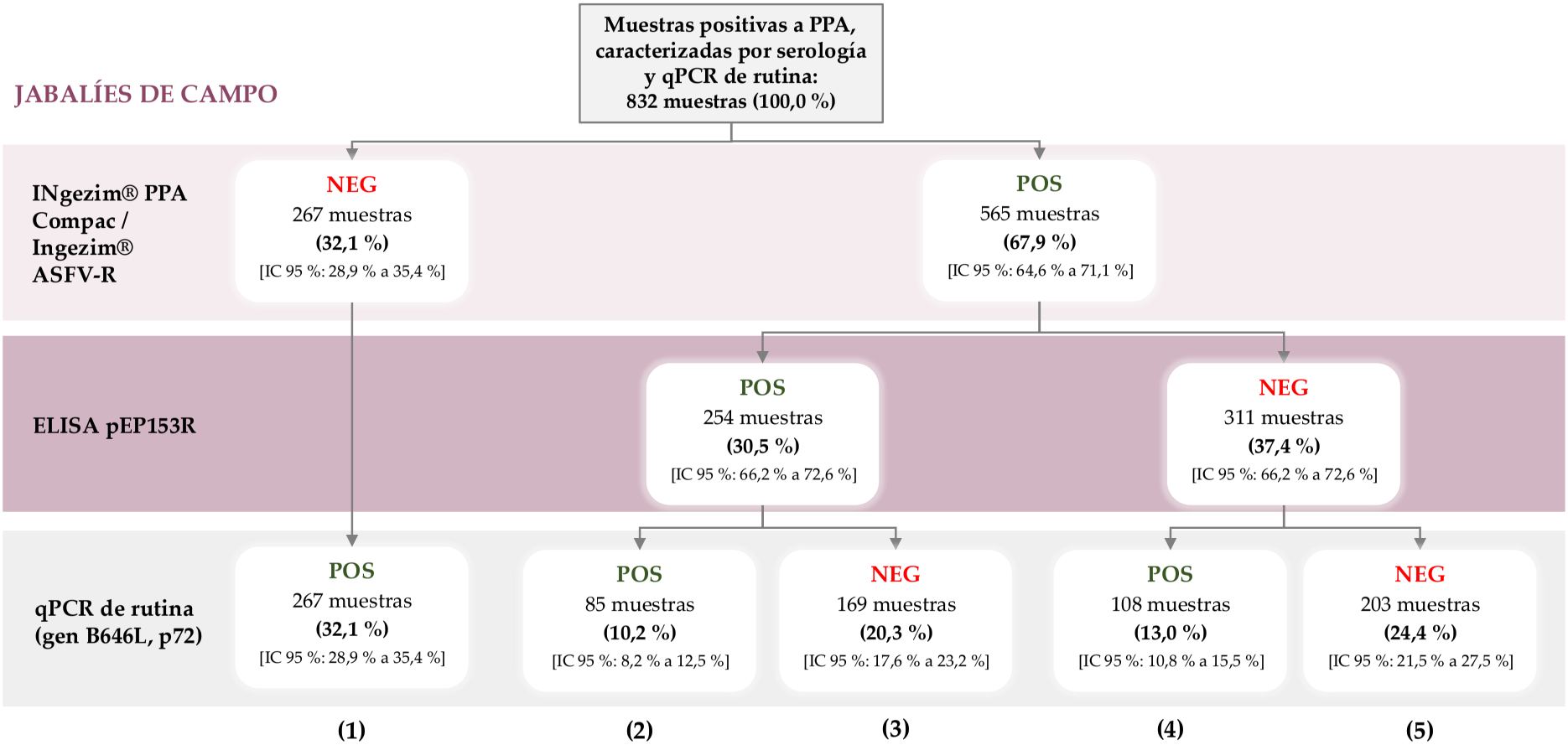


Figura IV.37. Flujo de la caracterización mediante serología y qPCR de rutina de las muestras positivas a PPA de jabalíes. Se muestra el porcentaje de cada grupo respecto al número total de muestras (832). Todas las muestras incluidas en este análisis fueron negativas en el ELISA eGFP.

Para analizar en detalle cómo este grupo 5 influiría en la precisión del diagnóstico DIVA, se identificó el mismo perfil de muestra (ELISA control: positivo; ELISA pEP153R, ELISA eGFP y qPCR: negativo) en los jabalíes experimentales vacunados, que habían sido analizados previamente en el apartado IV. 2. 2. 2. Como muestra la Figura IV.38, del total de muestras consideradas (n: 65), solo un 4,6 % [IC 95 %: 0,7–8,9 %] presentó dicho perfil (n: 3). Dos de estas 3 muestras fueron recogidas en el rango de [10-20) dpv, suponiendo en este intervalo de tiempo un 13,3 % [IC 95 %: 3,7–37,9 %] de las muestras totales (n. 15) (datos no mostrados).

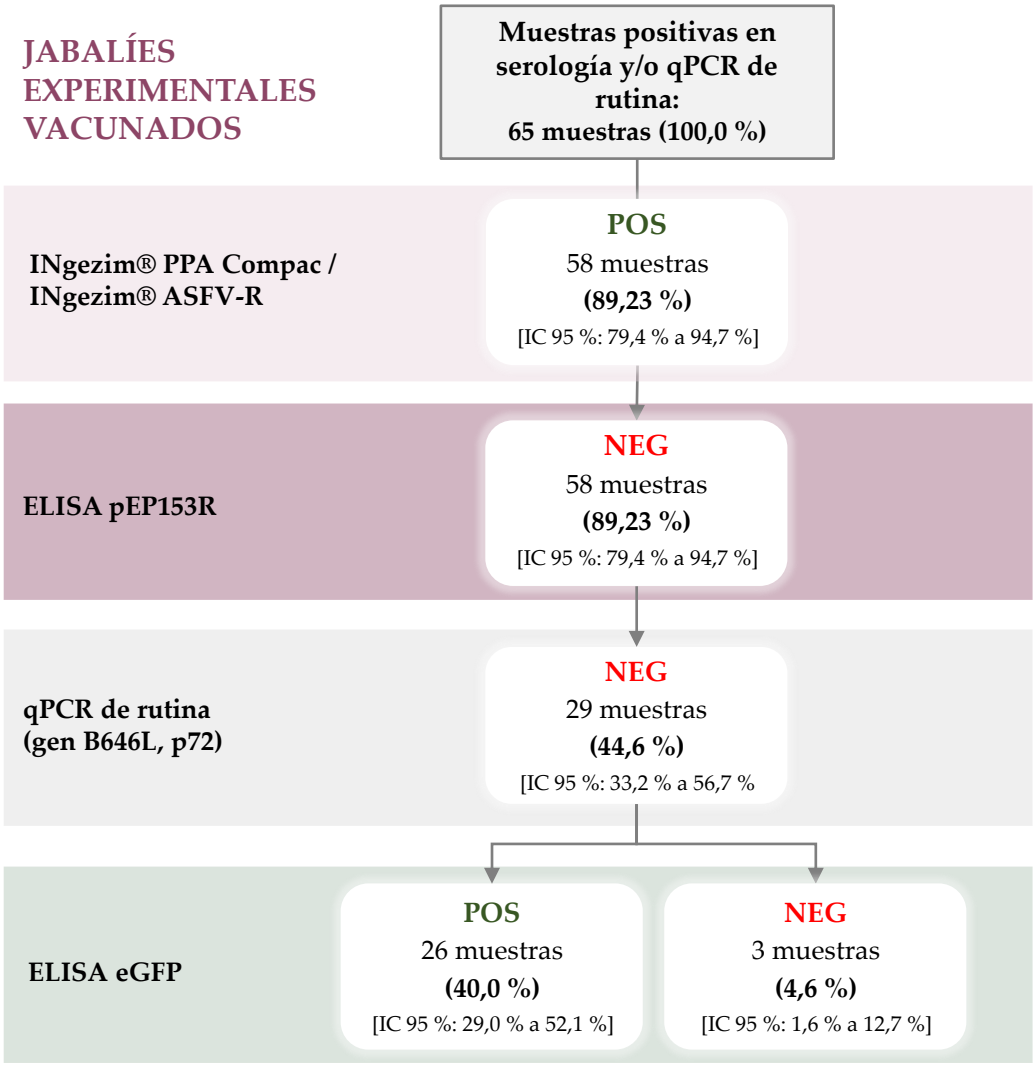


Figura IV.38. Flujo de la caracterización mediante ELISA DIVA y qPCR de rutina de los jabalíes experimentales vacunados. Se muestra el porcentaje de cada grupo respecto al número total de muestras (n: 65).

IV. 2. 4. 2 Muestras procedentes de cerdos de campo

Como se indicó previamente, la sensibilidad del ELISA pEP153R para muestras procedentes de cerdos de campo (n: 51) fue menor, que la detectada en jabalíes. Al agrupar las muestras por tipo de matriz, no se observaron diferencias estadísticamente significativas para ninguna de ellas (valor $p > 0,05$). Además, al igual que para las muestras de jabalíes, se realizó un **análisis conjunto de las muestras positivas a PPA, caracterizadas por serología y qPCR de rutina**. Como muestra la Figura IV.39, de las 247 muestras positivas a PPA analizadas, un 20,7 % [IC 95 %: 15,8–26,2 %] fue positivo a anticuerpos frente a la proteína control (INgezim® PPA Compac/INgezim® ASFV-R). Sin embargo, solo se detectaron anticuerpos frente a la pEP153R en un 1,6 % [IC 95 %: 0,5–4,1 %] de los animales analizados (grupo 2). La mayoría de las muestras resultaron positivas por PCR (grupos 1, 2 y 4), siendo negativas menos del 2 % [IC 95 %: 0,5–4,1 %] del total (grupos 3 y 5).

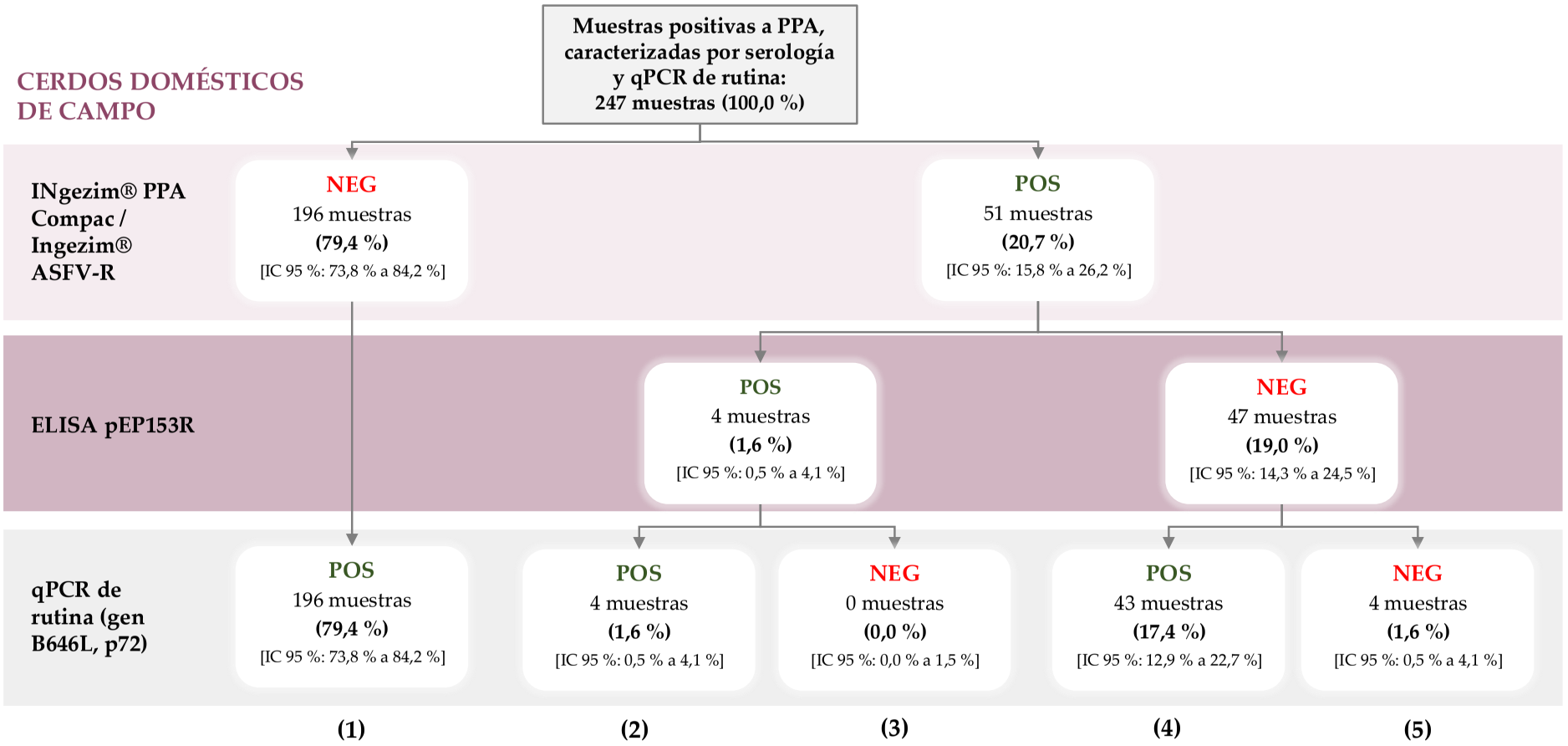


Figura IV.39. Flujo de la caracterización mediante serología y qPCR de rutina de las muestras positivas a PPA de cerdos domésticos. Se muestra el porcentaje de cada grupo respecto al número total de muestras (247).

IV. 2. 5 Transferencia del ensayo DIVA a un producto comercial

Para la adaptación de los ensayos desarrollados a un producto comercial, fue necesario evaluar su reproducibilidad y repetibilidad, así como su estabilidad. En todos los estudios descritos a continuación, se siguieron las condiciones de los ELISA indicadas en la Tabla IV.7.

IV. 2. 5. 1 Análisis de la caducidad de reactivos

Se evaluó la **caducidad acelerada de los antígenos tapizados y de los sueros control** de los dos ELISA indirectos desarrollados. La correlación entre la caducidad acelerada (24 °C) y la real (4 °C) estuvo basada en la ecuación de Arrhenius. La caducidad del AcM 1BH7-PO no se evaluó ya que había sido estudiada previamente en GSD Madrid. Para el estudio, el material analizado se conservó durante 2 meses a dos temperaturas diferentes: 4 °C y 24 °C. A los 15, 30, 45 y 60 días, se realizó el ensayo en paralelo usando el material almacenado a ambas temperaturas, e incluyendo, además, 2 sueros positivos límites para cada ensayo. Los sueros se guardaron en alícuotas para evitar ciclos de congelación/descongelación que pudiesen afectar a los resultados. Cada muestra se analizó por duplicado y su valor de DO se comparó con el obtenido a día 0, considerando este como el 100 % de la señal. Como se observa en la Figura IV.40, ninguna de las muestras analizadas perdió más del 25 % de la señal, tras 60 días a 24 °C y presentaron un compartimiento equivalente respecto a los reactivos almacenados a 4 °C (datos no mostrados). Estos resultados indicaron que tanto las placas tapizadas como los sueros control, presentaban una caducidad real de al menos dos años.

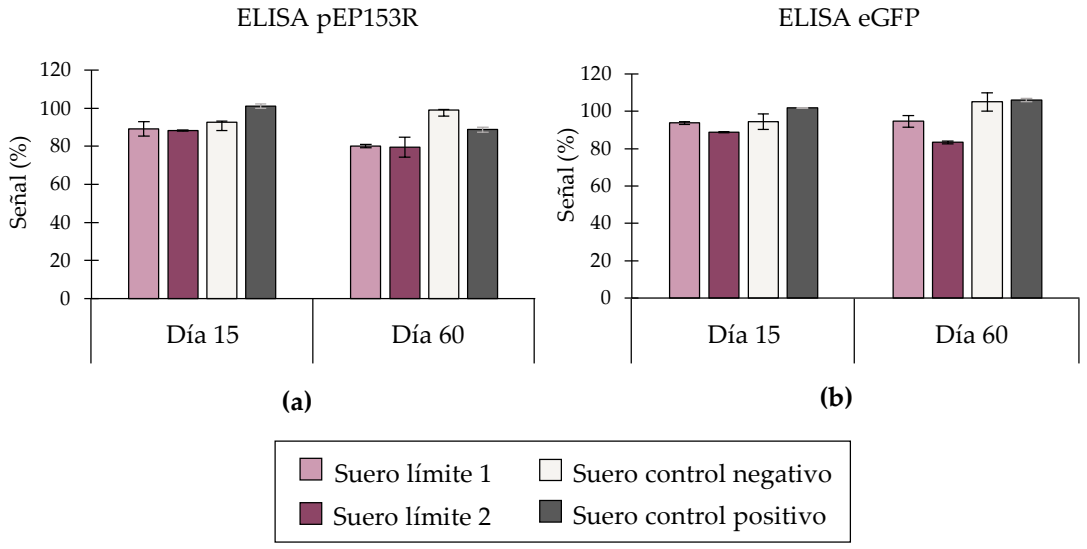


Figura IV.40. Estudio de la caducidad. (a) ELISA pEP153R; **(b)** ELISA eGFP. En cada gráfica, el eje de ordenadas muestra la señal obtenida respecto al día 0 en el ensayo y el eje de abscisas, el tiempo de almacenamiento de los reactivos. Se analizaron dos sueros límite y un suero control negativo y positivo. Cada barra indica la media de los duplicados ± la desviación estándar.

IV. 2. 5. 2 Análisis de la reproducibilidad del ensayo

Para evaluar la reproducibilidad de los ensayos desarrollados, se realizaron tres lotes de tapizado, utilizando dos lotes diferentes de antígeno. Con el objetivo de seleccionar la concentración de tapizado adecuada para cada lote, el antígeno se tapizó a la concentración seleccionada (Tabla IV.7), así como a la mitad y al doble de la misma. A continuación, se evaluó en paralelo la señal obtenida con el lote de antígeno tapizado de referencia, pudiendo ajustar para cada nuevo lote de tapizado, la dilución de conjugado utilizada en el ensayo. En este estudio, así como en todos los análisis de reproducibilidad descritos a continuación, se utilizó al menos 1 muestra negativa, 1 muestra positiva límite y, por último, 1 muestra positiva fuerte, para cada uno de los ensayos.

En cuanto a la **reproducibilidad interlote** de cada ELISA, cada muestra se analizó por duplicado, utilizando placas de ELISA de cada lote producido. Como muestra la Figura IV.41.a, los valores medios obtenidos entre los tres lotes de cada ensayo no superaron en ningún caso un coeficiente de variación (CV) superior al 10 %, considerado el límite aceptable de variabilidad cuando se realiza el control de calidad de cualquier ELISA en GSD Madrid. Por otro lado, para evaluar la **reproducibilidad interdía**, se realizaron los ELISA con las mismas muestras

analizadas en días distintos. Como se observa en la Figura IV.41.b, los resultados obtenidos en el día 1 y el día 2 fueron comparables entre sí. Para la muestra positiva fuerte, se obtuvo un CV de menos del 10 % y, tanto la muestra negativa como la positiva débil, mantuvieron la misma caracterización en los dos días.

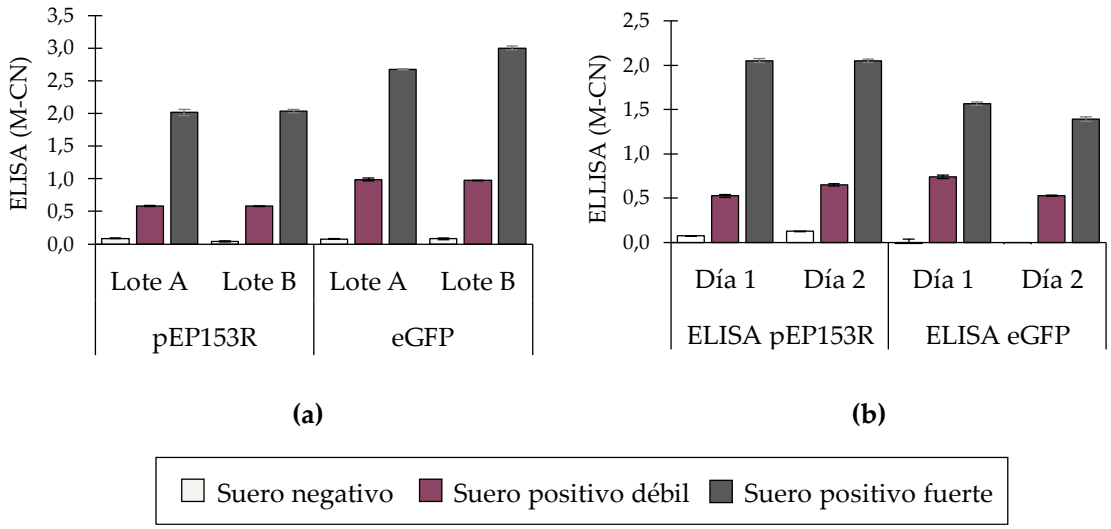


Figura IV.41. Análisis del a reproducibilidad del ELISA pEP153R y del ELISA eGFP. **(a)** reproducibilidad interlote; **(b)** reproducibilidad interdía. El eje de ordenadas representa el resultado obtenido en los ELISA, mientras que, en el eje de abscisas, se muestra la variable considerada. En ambos estudios, se utilizó 1 suero negativo, 1 suero positivo débil y 1 suero positivo fuerte para cada uno de los ensayos. Las barras representan la media de los valores obtenidos ± desviación estándar entre los duplicados.

IV. 2. 5. 3 Repetibilidad intraplaca e interplaca

La variabilidad intra- e interplaca se realizó para cuantificar la posible variabilidad detectada entre los distintos pocillos de las placas tapizadas. Para la evaluación de la variabilidad intraplaca, se seleccionó una placa completa de forma aleatoria de cada lote, mientras que, para la evaluación de la variabilidad interplaca, se emplearon tiras de diferentes placas de un mismo lote, a lo largo de todo el proceso de tapizado. Para ello, se utilizó el control positivo de cada ensayo diluido a la 1/2 y se calculó el CV entre las señales obtenidas. Así, se obtuvo un CV menor de 10 % para tres lotes de tapizado diferentes de cada antígeno (datos no mostrados).

IV. 3. DISEÑO Y DESARROLLO DE UN ENSAYO MÚLTIPLE DIVA: ELISA-MICROARRAY

Como se describió en el Capítulo II, el inmunoensayo DIVA diseñado y desarrollado hasta el momento estaba basado en tres ELISA independientes. En este capítulo se describe la adaptación de este ensayo a una plataforma múltiple: ELISA-*microarray*.

En el ELISA-*microarray* se incluyeron las proteínas seleccionadas previamente en el ELISA DIVA (p72, p30, pEP153R II-Fc y GST-eGFP) y la pEP153R I-Fc, para la detección de anticuerpos frente a infecciones con aislados del vPPA de genotipo I. Además, se incluyó la proteína E2, un antígeno empleado habitualmente en el diagnóstico de la PPC [156]. La producción de los antígenos pEP153R II-Fc, GST-eGFP y pEP153R I-Fc se describió en el Capítulo I, mientras que la de las proteínas p72, p30 y E2 se describe a continuación. Brevemente, la p72 se expresó en células de mamífero y se purificó mediante cromatografía de afinidad, empleando el AcM anti-p72 17DL3, a partir del sobrenadante del cultivo celular [157]. Por otro lado, las proteínas p30 y E2 ya estaban disponibles en GSD Madrid; ambas se obtuvieron de forma recombinante en células de insecto: la primera se purificó a partir de la fracción celular insoluble, mientras que la segunda se obtuvo del medio de cultivo y se purificó mediante cromatografía de afinidad usando una resina de cobre [150,158].

IV. 3. 1 Optimización de las condiciones del ensayo con muestras de suero

En primer lugar, se optimizaron las condiciones de impresión para cada uno de los antígenos. Para ello, se imprimieron diferentes concentraciones de cada una de las proteínas diana en placas de 96 pocillos de alta adherencia, utilizando dos **tampones comerciales de impresión** con y sin aditivos (M&M III. 2. 7. 3. 1). Para la comprobación de los puntos, el *microarray* se incubó con un cóctel de AcM (M&M III. 2. 7. 3. 1), obteniéndose en todos los antígenos impresos una mejor morfología y uniformidad con el tampón SciSpot Protein D1. A modo de ejemplo, en la Figura IV.42, se muestran las imágenes del ensayo para las proteínas GST-eGFP, pEP153R II-Fc y p30.

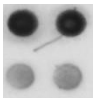
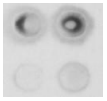
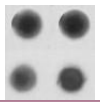
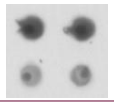
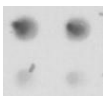
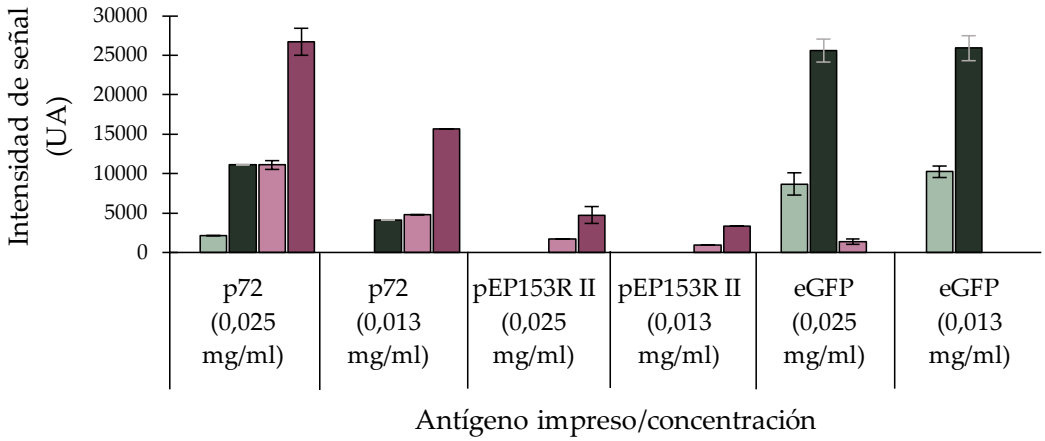
Antígeno		Tampón de impresión	
Nombre	Concentración	*SciSpot Protein D1* (Scienion)	*Microarray Printing Buffer* (Arrayit)
p30	0,1 mg/ml 0,05 mg/ml		
pEP153R genotipo II	0,025 mg/ml 0,013 mg/ml		
eGFP	0,025 mg/ml 0,013 mg/ml		

Figura IV.42. Optimización del ELISA-*microarray* para los puntos correspondientes a los antígenos p30, pEP153R II-Fc y GST-eGFP. Se usaron dos tampones diferentes (SciSpot Protein D1 o Protein Printing Buffer) y distintas concentraciones de antígeno en la impresión de cada punto.

La uniformidad de los puntos de las proteínas pEP153R II-Fc y GST-eGFP mejoró al añadir una concentración de $3{,}75 \cdot 10^{-3}$ % de sarcosilo al tampón de impresión.

Por otro lado, la **concentración óptima del antígeno** se escogió en función de la mayor diferencia entre la señal de muestras positivas débiles y de muestras negativas obtenida en el ensayo múltiple. A modo de ejemplo, en la Figura IV.43 se muestran los resultados de los antígenos p72, pEP153R II-Fc y GST-eGFP, empleando 5 sueros experimentales: suero 1 (procedente de un cerdo doméstico no infectado); sueros 2 y 3 (de un cerdo doméstico vacunado con Lv17/WB/Rie1-Δ153); y sueros 4 y 5 (procedentes de un cerdo doméstico infectado con Lv17/WB/Rie1) (Grupo A1 y A2, Tabla III.11). La concentración de impresión de los tres antígenos se seleccionó en función de la señal más alta detectada con el suero débil en cada caso, siendo de 0,025 mg/ml para las proteínas p72 y pEP153R II-Fc y de 0,013 mg/ml para el antígeno GST-eGFP. En el caso de la pEP153R II-Fc, al no detectarse fondos con los sueros negativos, fue posible aumentar la concentración de impresión hasta 0,035 mg/ml, incrementando así la señal de los sueros positivos límites y no la de las muestras negativas (datos no mostrados). Las concentraciones de impresión seleccionadas para los otros antígenos se indican en la Tabla IV.14.



	p72	pEP153R II	eGFP
Suero 1	-	-	-
Suero 2	+	-	+
Suero 3	++	-	++
Suero 4	++	+	-
Suero 5	++	++	-

Figura IV.43. Optimización del ELISA-*microarray* para los antígenos p72, pEP153R II-Fc y GST-eGFP. En el eje de ordenadas, se representa la intensidad de señal obtenida en el ensayo y, en el eje de abscisas, se muestran dos concentraciones de impresión para cada antígeno. La caracterización de las muestras en los ELISA de referencia se indica en la tabla: negativos (-), positivos débiles (+) y positivos fuertes (++).

Sin embargo, cuando se analizó un mayor número de sueros negativos en el ensayo múltiple, se detectaron señales cercanas a las de los valores obtenidos con los sueros positivos límites frente a la proteína GST-eGFP. Debido a ello, se volvió a optimizar las condiciones de impresión para este punto, disminuyendo la concentración de antígeno y coimprimiéndolo con una proteína no relacionada, Der f 2. Como se observa en la Figura IV.44, al utilizar la proteína eGFP a 0,0065 mg/ml y Der f 2 a 0,025 mg/ml, se eliminaron los resultados falsos positivos, aumentando también la señal del suero positivo. La señal detectada fue específica frente a la eGFP, ya que no se detectó señal en el punto impreso únicamente con la proteína Der f 2 a la misma concentración.

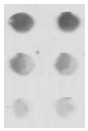
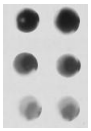
Antígeno(s) impreso(s)		Muestra			
Concentración eGFP	Concentración Der f 2	Suero negativo	Suero negativo (animal infectado)	Suero positivo débil	Suero positivo fuerte
0,013 mg/ml	-				
0,0065 mg/ml	-				
0,0035 mg/ml	-				
0,013 mg/ml	0,25 mg/ml				
0,0065 mg/ml	0,25 mg/ml				
0,0035 mg/ml	0,25 mg/ml				
-	0,25 mg/ml				

Figura IV.44. Análisis de la impresión del antígeno eGFP. Se analizaron 4 muestras de suero diferentes, caracterizados en ELISA eGFP, frente a diferentes concentraciones de los antígenos. Se imprimieron distintas concentraciones del antígeno eGFP, junto con la proteína coimpresa Der f 2.

La posición de los antígenos impresos en el *microarray* y las condiciones óptimas de impresión para cada antígeno se detallan en la Figura IV.45 y en la Tabla IV.14, respectivamente.

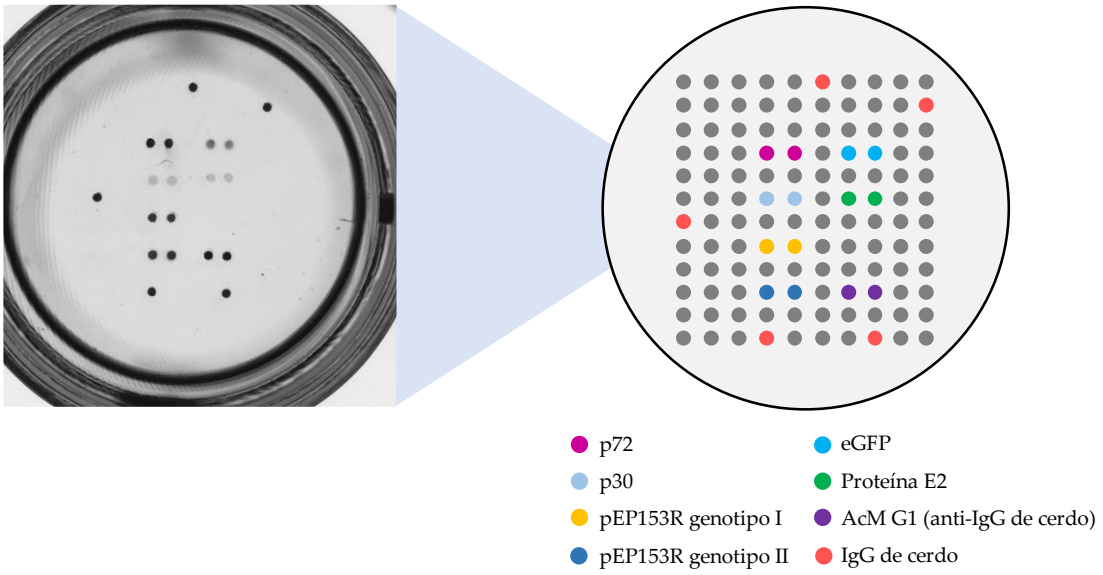


Figura IV.45. Configuración final del *microarray*. A la izquierda, imagen del *microarray*, tras el ensayo de validación de la impresión, conteniendo todos los antígenos utilizados; y a la derecha, esquema de la posición relativa de los antígenos y los controles posicionales (IgG de cerdo) en el *microarray*, colocados en una gradilla teórica 12x10. Los puntos grises de la gradilla corresponden a puntos vacíos.

En paralelo, se establecieron las condiciones del inmunoensayo, probando diferentes diluciones y tampones de muestra, así como diluciones del AcM anti-IgG de cerdo, 1BH7-PO. Las condiciones finales del ensayo se indican en la Tabla IV.14.

Tabla IV.14. Condiciones de impresión del *microarray* y del ELISA-*microarray* DIVA.

Parámetro del ELISA-*microarray*	**Condición seleccionada**			
Impresión	*Proteína impresa*	*Concentración en el tampón de impresión (mg/ml)*	*Tampón de impresión*	*Antígeno coimpreso*
	p72	0,025	S	No
	p30	0,0125	S	No
	pEP153R II-Fc	0,035	SM	No
	GST-eGFP	0,0065	SM	Sí
	pEP153R I-Fc	0,025	S	No
	E2	0,150	S	No
	AcM G1	0,0125	S	No
	IgG	0,025	S	No
Muestra de suero	Dilución	Suero: 1/100		
	Diluyente	DE34		
	Tiempo	1 h		
	Temperatura	Ta (20-24 °C)		
Conjugado	AcM	1BH7-PO		
	Dilución	1/20.000		
	Tiempo	1 h		
	Temperatura	Ta (20-24 °C)		
Revelado	Sustrato	TMB		
	Solución de parada	H_2O		
	Tiempo	10 min		

*S: tampón Scienion; SM tampón Scienion + 0,00375 % sarcosilo. AcM: anticuerpo monoclonal.

IV. 3. 2 Análisis con muestras de sueros

Una vez optimizado el ensayo, se analizaron 236 muestras de suero: 143 experimentales procedentes de cerdos domésticos (Tabla IV.15) y 93 de campo, procedentes de cerdos negativos a PPA y PPC. Los resultados se analizaron mediante una curva ROC, obteniéndose para todos los antígenos, un valor p menor que 0,5. Por tanto, el ensayo múltiple permitió diferenciar entre muestras positivas y negativas a anticuerpos frente a cada uno de los antígenos analizados. Además, el diagrama interactivo de puntos del análisis ROC se utilizó para establecer los puntos de corte de los ensayos (Figura IV.46).

Tabla IV.15. Muestras experimentales analizadas mediante ELISA-*microarray*.

Virus	Estado del animal		No. negativos[1]	No. positivos[1]	Grupo[2]
vPPA	Infectado con genotipo II	Lv17/WB/Rie1	23	19	A1
		ES16/WB-Viru8	6	9	C
	Infectado con otro genotipo	NH/P68	10	11	D
		Benin 97/1-Δ148R	2	4	D
		ET13/1504	12	9	E
	Vacunado	Lv17/WB/Rie1-Δ153	8	7	A2
vPPC	-	-	1	16	-
Otros Pestivirus	-	-	0	6	-

[1]La caracterización de las muestras viene dada por los ensayos ELISA: INgezim® PPA Compac (vPPA), INgezim® CSF Compac (vPPC) y test de neutralización (otros Pestivirus). [2]El grupo hace referencia a la Tabla III.11.

Para la detección de anticuerpos frente a la **proteína p72** del vPPA se estableció un punto de corte de IS superior a 2.652 UA (Figura IV.46.a). De las muestras caracterizadas como positivas con el INgezim® PPA Compac (n: 59), 57 dieron un resultado de IS superior al punto de corte en el ensayo múltiple, no detectándose únicamente 2 muestras positivas límite, llevando a un valor de sensibilidad del 96,6 % [IC 95 %: 88,3–99,5 %]. Por otro lado, de las 177 muestras negativas analizadas, 1 dio un resultado falso positivo, determinando una especificidad para el ensayo del 99,4 % [IC 95 %: 96,9–99,9 %], pero esta muestra había sido caracterizada como positiva en IPT. Respecto al **antígeno p30**, se estableció como punto de corte en el ensayo múltiple una IS mayor de 8.000 UA (Figura IV.46.b). El ELISA-*microarray* exhibió los mismos parámetros diagnósticos que el ELISA de referencia INgezim® ASFV-R, para las 60 muestras positivas y 176 muestras negativas analizadas, obteniéndose una sensibilidad y especificidad del 100,0 % [IC 95 %: 94,0–100,0 %; 97,9–100,0 %, respectivamente].

Respecto al antígeno **pEP153R de genotipo II**, se estableció como punto de corte en el ensayo múltiple un valor de IS superior a 7.500 UA, mostrando una sensibilidad del 92,9 % [IC 95 %: 66,1–98,8 %] y una especificidad del 99,6 % [IC 95 %: 97,5–99,9 %] (Figura IV.46.c). De las 230 muestras analizadas, 14 muestras se caracterizaron como positivas y 222 como negativas en el ELISA pEP153R de genotipo II. Todas las muestras positivas, a excepción de una muestra positiva límite en el ELISA de referencia, se detectaron en el ensayo múltiple, mientras que únicamente 1 muestra negativa dio resultado falso positivo con el ELISA-*microarray*.

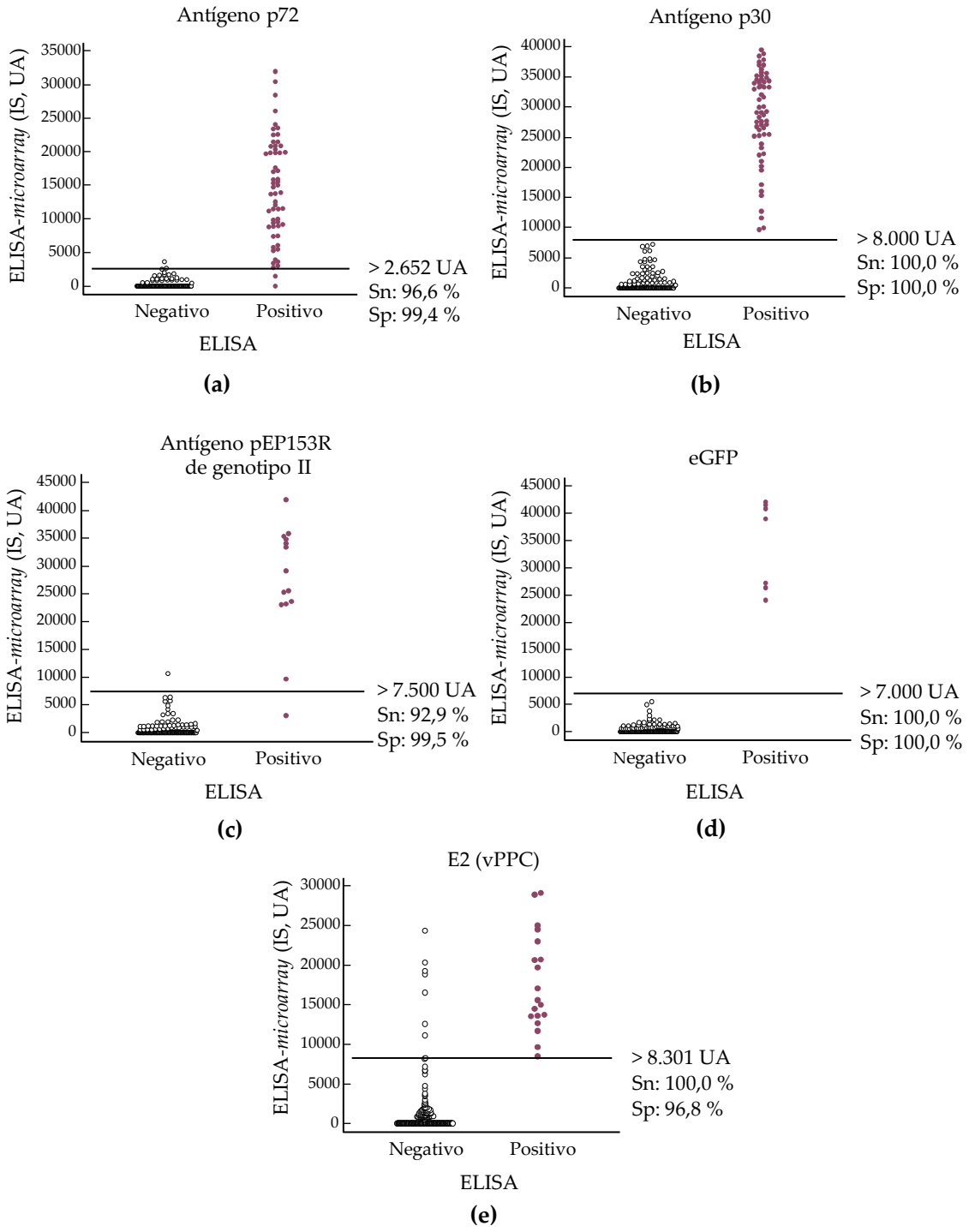


Figura IV.46. Diagrama interactivo de puntos (análisis ROC) del ELISA-*microarray* para los antígenos incluidos en el ensayo. (a) p72; **(b)** p30; **(c)** pEP153R de genotipo II; **(d)** eGFP; **(e)** E2. En todas las gráficas, el eje de ordenadas muestra el valor de intensidad de señal (IS), y el eje de abscisas la clasificación de las muestras en positivo o negativo, según los ELISA de referencia. Para cada antígeno, se muestra el punto de corte óptimo, la sensibilidad (Sn) y especificidad (Sp).

En cuanto al **antígeno eGFP**, se estableció como punto de corte una IS mayor de 7.000 UA para el ensayo múltiple (Figura IV.46.d), con las 7 muestras positivas y 229 negativas caracterizadas previamente por el ELISA eGFP. Este punto de corte resultó en una sensibilidad y especificidad del 100,0 % [IC 95 %: 58,9–100,0 %; 98,4–100,0 %, respectivamente]. Por tanto, se obtuvo una concordancia perfecta con el ensayo de referencia.

Por otro lado, sólo se disponía de 4 muestras positivas frente a la **pEP153R de genotipo I**, por lo que no fue posible la determinación de los parámetros diagnósticos mediante una curva ROC. Sin embargo, considerando un punto de corte de IS superior a 10.500 UA, se obtuvo un valor preliminar de sensibilidad del 100,0 % [IC 95 %: 40,2–100,0 %] y de especificidad del 99,6 % [IC 95%: 97,6–99,9 %], respecto al ELISA indirecto basado en la detección de anticuerpos frente a la pEP153R de genotipo I. De este modo, se detectaron las 4 muestras positivas analizadas (procedentes de un animal infectado con Benin 197/1-Δ148R) en el ensayo múltiple, y ningún falso positivo de las 232 muestras negativas analizadas. Respecto a la **proteína E2** (Figura IV.46.e), para el punto de corte seleccionado (IS > 8.301 UA) el valor de sensibilidad del ensayo múltiple fue del 100,0 % [IC 95 %: 82,2–100,0 %] y el de especificidad del 96,8 % [IC 95 %: 93,5–98,7 %]. Las 19 muestras positivas caracterizadas por el ensayo comercial INgezim® CSF Compac se detectaron en el ensayo múltiple, mientras que, de las 217 muestras negativas, 7 fueron falsos positivos que procedían de cerdos de la misma granja.

IV. 4. DISEÑO Y PUESTA A PUNTO DE ENSAYOS RÁPIDOS DE CAMPO

En la primera parte del apartado, se describe la transferencia del ensayo DIVA desarrollado en formato ELISA a una plataforma de diagnóstico rápido en campo. En este contexto, se desarrollaron ensayos individuales de LFA para la detección de anticuerpos frente a los antígenos pEP153R de genotipo II y eGFP, utilizando muestras de sueros procedentes de animales infectados y vacunados experimentalmente. El LFA para la detección de anticuerpos frente a la p72 ya estaba disponible en la empresa (INgezim® PPA CROM Anticuerpo, GSD Madrid).

Además, en la segunda parte de este apartado, se realizó una validación en campo del ensayo rápido de detección simultánea de antígeno p72 y anticuerpos frente a la misma proteína viral (INgezim® ASFV Combo CROM Ag/Ab), para la detección combinada de ambos.

IV. 4. 1 Ensayo LFA DIVA

IV. 4. 1. 1 LFA eGFP

El LFA para la detección de anticuerpos frente a la eGFP se desarrolló en un formato de doble reconocimiento. Como reactivo revelador se utilizó la proteína eGFP, conjugada a nanopartículas de látex rojo a 1 mg/m^2, y como reactivo de captura, la misma proteína tapizada en la línea test de la membrana de nitrocelulosa.

Inicialmente, se consideraron las 3 versiones recombinantes del antígeno: His-eGFP (*E. coli*), GST-eGFP e His-eGFP (Sf9). Para seleccionar la proteína eGFP que mejor funcionaba como reveladora o reactivo de captura, se montaron las tiras inmunocromatográficas utilizando las nanopartículas conjugadas a una concentración de 0,1 % en el coloide y las proteínas tapizadas en membrana HF120 a la mayor cantidad que permitía la concentración de la proteína purificada (0,5 mg/ml para los antígenos His-eGFP (*E. coli*) e His-eGFP (Sf9), y 0,25 mg/ml para la proteína GST-eGFP). Las distintas combinaciones de los reactivos dieron lugar a 9 tiras diferentes, numeradas del 1 al 9 (Tabla IV.16).

En primer lugar, se **seleccionó el diluyente de muestra** de LFA adecuado para el ensayo, empleando distintas condiciones de pH, fuerza iónica y bloqueo de uniones inespecíficas. La valoración consistió en el análisis de la intensidad y

especificidad de la señal resultante en la línea control y la línea test, respectivamente, al añadir solamente el diluyente de muestra de LFA. En esta evaluación inicial, las combinaciones eGFP-7, eGFP-8 y eGFP-9 fueron descartadas, ya que se producían uniones inespecíficas en la línea test usando la proteína His-eGFP (Sf9) como reactivo de captura.

Tabla IV.16. Combinaciones iniciales de los reactivos reveladores y de captura en el LFA eGFP, numeradas del 1 al 9.

		Reactivo revelador (nanopartículas conjugadas)		
		Látex rojo-His-eGFP (*E. coli*) 0,1 %	Látex rojo-GST-eGFP 0,1 %	Látex rojo-His-eGFP (Sf9) 0,1 %
Reactivo de captura (membrana	His-eGFP (*E. coli*) 0,5 mg/ml	eGFP-1	eGFP-2	eGFP-3
	GST-eGFP 0,25 mg/ml	eGFP-4	eGFP-5	eGFP-6
	His-eGFP (Sf9) 0,5 mg/ml	eGFP-7	eGFP-8	eGFP-9

A continuación, se probó la **sensibilidad analítica del ensayo**, utilizando el AcM anti-eGFP 8D2E3, diluido a 1 μg/ml en el diluyente de muestra seleccionado previamente. En esta prueba se obtuvo una intensidad de señal más alta con las combinaciones numeradas del 4 al 6. Por tanto, se seleccionó la proteína GST-eGFP como reactivo de captura.

Seguidamente, se evaluó la **especificidad** del ensayo analizando muestras de suero caracterizadas como negativas por el ELISA eGFP (Grupo A1, Tabla III.11). En las tres combinaciones seleccionadas (eGFP-4, eGFP-5 y eGFP6), se observó señal inespecífica en la línea test, por lo que fue necesario una nueva optimización de la capacidad bloqueante del diluyente de muestra de LFA, y una nueva comprobación de la sensibilidad analítica del ensayo. Tras este ajuste, los mejores resultados en cuanto a especificidad y sensibilidad se obtuvieron con la combinación eGFP-5, seleccionando así el antígeno GST-eGFP también como reactivo revelador.

Una vez seleccionado el antígeno de ambos reactivos, se evaluaron distintas concentraciones de los mismos, dando lugar a 6 nuevas combinaciones numeradas del 10 al 15 (Tabla IV.17). Tras evaluar la sensibilidad y especificidad de las nuevas combinaciones, se seleccionó la concentración de 0,15 % para el reactivo revelador y 0,1 mg/ml para el reactivo de captura (combinación eGFP-15).

Tabla IV.17. Combinaciones para la selección de la concentración del reactivo revelador y del reactivo de captura en el LFA eGFP, numeradas del 10 al 15.

		Reactivo revelador: látex rojo-GST-eGFP		
		0,05 %	0,1 %	0,15 %
Reactivo de captura: GST-eGFP	0,2 mg/ml	eGFP-10	eGFP-11	eGFP-12
	0,1 mg/ml	eGFP-13	eGFP-14	eGFP-15

A continuación, se analizó un mayor número de sueros negativos procedentes de animales de campo de zonas libres de PPA. En 8 de los 108 sueros negativos analizados, se visualizó una señal inespecífica, además de no homogénea, en la línea test. Por tanto, se realizó una última optimización del ensayo, ajustando los materiales empleados en la tira, para mejorar el flujo de la migración de los reactivos y reducir las interacciones inespecíficas. Los mejores resultados se observaron al cambiar el absorbente de muestra, disminuyendo el número de falsos positivos a 3 y obteniendo una señal homogénea en la línea test y control. Las condiciones finales del ensayo se detallan en la Tabla IV.18.

Tabla IV.18. Condiciones finales del LFA eGFP.

Componente	Nombre
Reactivo revelador	Látex rojo-GST-eGFP (0,15 %)
Reactivo de captura	GST-eGFP (0,1 mg/ml)
Membrana	HF120
Absorbente de muestra	Grade 1668
Adhesivo	No
Absorbente superior	Sí
Carcasa	Sí
Diluyente de muestra	Diluyente TDM-4

Con estas **condiciones finales**, se analizaron 9 muestras de suero positivas, siendo 3 de ellas positivas débiles, procedentes de animales vacunados experimentalmente (Grupo A2, Tabla III.11), resultando en un valor de sensibilidad del 100 % [IC 95 %: 66,2–100,0 %]. Respecto a la especificidad, se analizó un total de 249 muestras de suero negativas, de las cuales 141 procedían de animales experimentales (Grupos A1, C y D, Tabla III.11) y 108 de animales de campo de zonas libres de PPA. De estas 249 muestras negativas totales, 109 presentaban anticuerpos frente a otras enfermedades/vacunas porcinas: 46 frente al vPPA,

4 frente a vacunas prototipo de PPA (con la proteína mCherry como marcador positivo), 23 a tuberculosis, 20 a Mal Rojo y Aujeszky, y 16 a PPC. El análisis de todas las muestras resultó en una especificidad para el ensayo del 98,8 % [IC 95 %: 96,5–99,7 %].

IV. 4. 1. 2 LFA pEP153R de genotipo II

De forma similar, el ensayo rápido para la detección de anticuerpos frente a la pEP153R de genotipo II se desarrolló en un formato de doble reconocimiento, utilizando como reactivo de captura y revelador la versión recombinante pEP153R II-Fc. Se probaron tres concentraciones diferentes de cada uno de los reactivos en las tiras, dando lugar a 9 combinaciones distintas numeradas del 1 al 9 (Tabla IV.19).

Tabla IV.19. Combinaciones para la selección de la concentración del reactivo revelador y del reactivo de captura en el LFA pEP153R de genotipo II, numeradas del 1 al 9.

		Reactivo revelador: látex rojo-pEP153R II-Fc (1 mg/m²)		
		0,1 %	0,15 %	0,2 %
Reactivo de captura: pEP153R II-Fc	0,2 mg/ml	pEP153R-1	pEP153R-2	pEP153R-3
	0,5 mg/ml	pEP153R-4	pEP153R-5	pEP53R-6
	1,0 mg/ml	pEP153R-7	pEP153R-8	pEP153R-9

El procedimiento de optimización del ensayo fue el mismo que el seguido para el ensayo rápido de la eGFP. En este contexto, se probaron diferentes diluyentes de muestra de LFA y se analizaron 4 muestras de suero positivas y 4 de muestras de suero negativas (Grupo A1, Tabla III.11). Los mejores resultados se obtuvieron con la combinación pEP153R-4. Sin embargo, los parámetros preliminares obtenidos no fueron compatibles con el desarrollo de un diagnóstico, ya que, aunque no había interacciones inespecíficas de los reactivos con el diluyente, se alcanzó una sensibilidad del 100 % [IC 95 %: 40,2–100,0 %] con una intensidad de señal máxima de 7 sobre 10, pero una especificidad del 25 % [IC 95 %: 4,1–79,7 %]. Este último valor resultó al detectar 3 falsos positivos de los 4 sueros negativos analizados, con un valor medio de intensidad 6 en la escala visual empleada como referencia.

Debido a estos resultados, se intentó aumentar la intensidad de señal del ensayo con las muestras positivas mediante diferentes aproximaciones: (1) bajando la concentración de proteína en la superficie de las nanopartículas de látex rojo a 0,5 mg/m², (2) probando membranas con un tamaño de poro menor para ralentizar la migración del flujo, y/o (3) cambiando el tipo de nanopartículas a conjugar (látex

negro u oro coloidal). Sin embargo, ninguna de las aproximaciones consideradas mejoró los parámetros diagnósticos: no se aumentó la intensidad de la señal de la línea test con muestras positivas, ni se eliminaron las señales inespecíficas obtenidas con las muestras negativas. Por tanto, se concluyó que la pEP153R II-Fc no era apta como antígeno diana en ensayos rápidos.

Para investigar la posible causa de las reacciones inespecíficas observadas con el antígeno diana, se utilizó un antígeno negativo con etiqueta Fc, expresado y purificado de la misma forma que la pEP153R II-Fc. Este antígeno se utilizó como reactivo de captura y como reactivo revelador del ensayo, en las mejores condiciones que se habían seleccionado para el ensayo con la pEP153R II-Fc. En estas condiciones, se observaron las mismas señales en la línea test del ensayo cuando se analizaron las muestras de suero negativas. En este punto, se requieren más estudios para continuar con el desarrollo del ensayo.

IV. 4. 2 Ensayo LFA doble: detección simultánea de antígeno y anticuerpo

Para la detección combinada de antígeno y anticuerpos frente al vPPA, se utilizó una nueva adaptación de LFA, donde se combinó una tira correspondiente al ensayo de detección de antígeno y una segunda, para la detección de anticuerpos, en un dispositivo doble. El ensayo combinado se denominó INgezim® ASFV Combo CROM Ag/Ab (Figura IV.47).

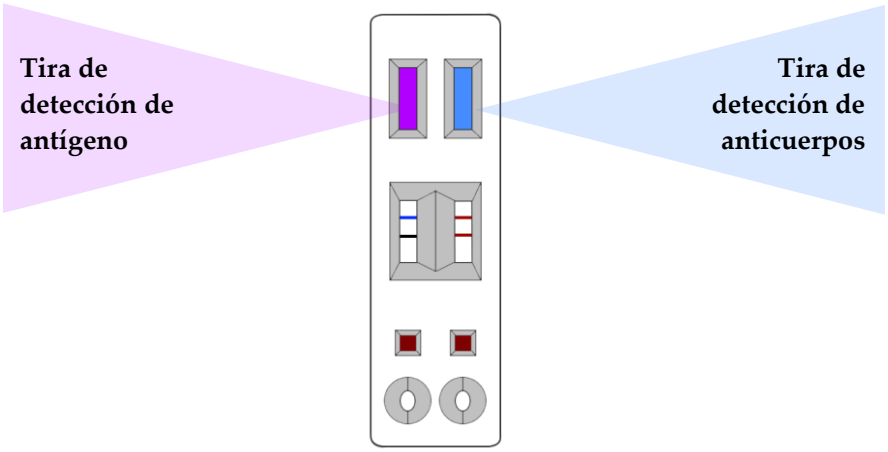


Figura IV.47. Ensayo INgezim® ASFV Combo CROM Ag/Ab. A la izquierda, la tira de detección de antígeno (en color morado) y a la derecha, la de detección de anticuerpos (en color azul). En cada tira, la línea superior corresponde a la línea control y la inferior, a la línea test.

Aunque ya se disponía de LFA individuales en la empresa (INgezim® PPA CROM Anticuerpo y INgezim® ASFV CROM Ag), los LFA individuales incluidos en el ensayo combinado correspondieron a nuevas versiones de los mismos. Las mejoras implicaron el uso de reactivos recombinantes, consiguiendo aumentar los parámetros diagnósticos, tal y como se detalla en las publicaciones Aira et al. 2023 (INgezim® PPA CROM Ab 2.0) y Aira et al. 2024 (INgezim® ASFV CROM Ag 2.0) [152,153].

Para analizar la sensibilidad del ensayo INgezim® ASFV Combo CROM Ag/Ab, se analizó un total de 332 muestras de sangre procedentes de animales infectados con el vPPA, recogidas en regiones donde el vPPA ha circulado en la última década (M&M III. 1. 8. 2. 2). Del total de muestras, 126 procedían de cerdos domésticos y las otras 206, de jabalíes. Estas muestras estaban caracterizadas como **positivas por qPCR de rutina y/o serología** (ELISA o IPT). Para el cálculo de los parámetros diagnósticos, se consideró una muestra positiva en el ensayo combinado cuando resultó positiva por algunas de las dos tiras que lo componen. Además, para el análisis de los resultados, las muestras positivas se agruparon según la carga genómica detectada en la qPCR de rutina.

El **análisis conjunto de los datos** (Figura IV.48) reveló que para muestras con un Ct < 15, la tira de detección de antígeno mostró una sensibilidad del 100 % [IC 95 %: 82,4–100 %] en las 18 muestras analizadas. A medida que la carga viral disminuía, indicado por un aumento en el valor de Ct, se redujo el número de positivos detectados en la tira de detección de antígeno. En estos casos, la detección de anticuerpos jugó un papel complementario en la identificación de animales infectados, aumentando el porcentaje de animales positivos detectados. La mejora fue más evidente en el grupo de muestras con un valor de Ct ≥ 25, en donde se pasó de un 36,7 % [IC 95 %: 24,7–50,7 %] de positivos en la tira de detección de antígeno, a un 73,5 % [IC 95 %: 59,7–83,8 %] en el ensayo combinado. Por otro lado, para las muestras negativas en qPCR y positivas a anticuerpos (n: 99), el ensayo INgezim® ASFV Combo CROM Ag/Ab detectó el 93,9 % [IC 95 %: 87,4–97,2 %] de las mismas como positivas. Poniendo en conjunto todos los datos mostrados en la gráfica, la detección combinada mostró una **sensibilidad global** del 88,9 % [IC 95 %: 85,0–91,2 %].

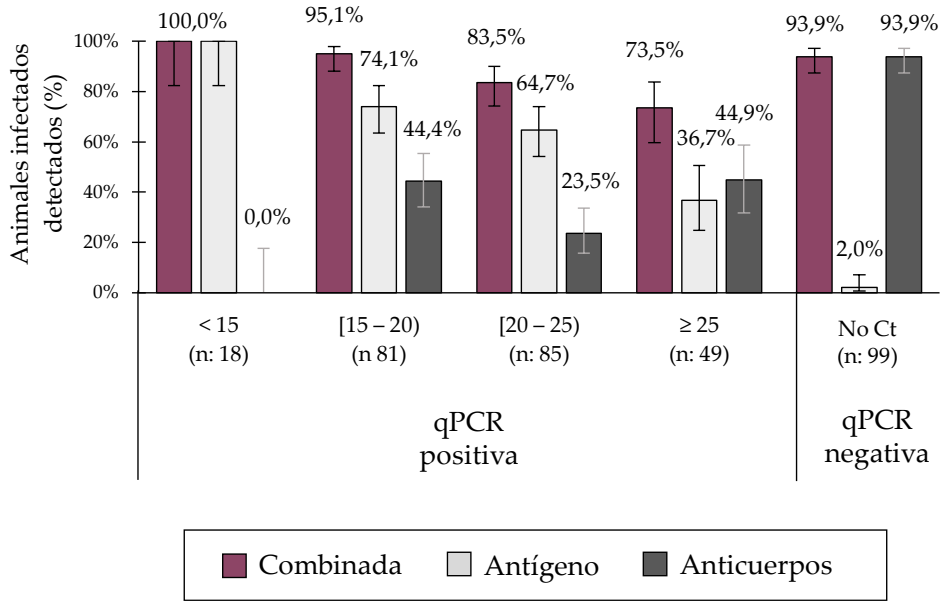


Figura IV.48. Análisis de muestras de sangre procedentes de animales de campo infectados con el vPPA en el ensayo INgezim® ASFV Combo CROM Ag/Ab. El eje de ordenadas muestra el porcentaje de animales positivos detectados con la tira de antígeno, o anticuerpo, o en la detección combinada de ambas tiras. En el eje de abscisas, se agrupan las muestras según el valor de Ct obtenido en qPCR de rutina.

El análisis de los datos también se llevó a cabo agrupando las muestras por tipo de animal. Como muestra la Figura IV.49.a, ninguna de las muestras procedentes de **cerdos domésticos** estaba caracterizada como positiva en serología y negativa en la qPCR de rutina. Esta caracterización previa se reflejó en los resultados obtenidos con el ensayo combinado de LFA, ya que la detección de anticuerpos solo mejoró ligeramente el porcentaje de animales infectados detectados, pasando de un 84,1 % [IC 95 %: 76,6–90,0 %] en la tira de antígeno, a un 90,5 % [IC 95 %: 84,0–95,0 %] en el ensayo combinado.

Por otro lado, cuando se analizaron las **muestras de jabalíes**, se observó una sensibilidad más baja en la tira de antígeno, respecto a la que había mostrado el ensayo en muestras procedentes de cerdos domésticos. Respecto a la detección combinada, el nuevo LFA Combo mejoró la identificación de animales salvajes infectados (Figura IV.49.b). Concretamente, el porcentaje incrementó de un 56,1 % [IC 95 %: 41,0–70,1 %] a un 90,2 % [IC 95 %: 77,4–96,1 %] en el grupo de muestras con un valor de Ct de entre 15 y 20; de un 39,0 % [IC 95 %: 25,7–54,3 %] a un 75,6 % [IC 95 %: 60,7–86,2 %] para el siguiente grupo de muestras; y finalmente, pasó de

un 13,6 % [IC 95 %: 4,7–33,3 %] a un 77,3 % [IC 95 %: 56,6–89,9 %] en muestras con un valor de Ct ≥ 25. Además, todas las muestras caracterizadas como negativas por qPCR y positivas por serología del total de muestras analizadas, procedían de jabalíes.

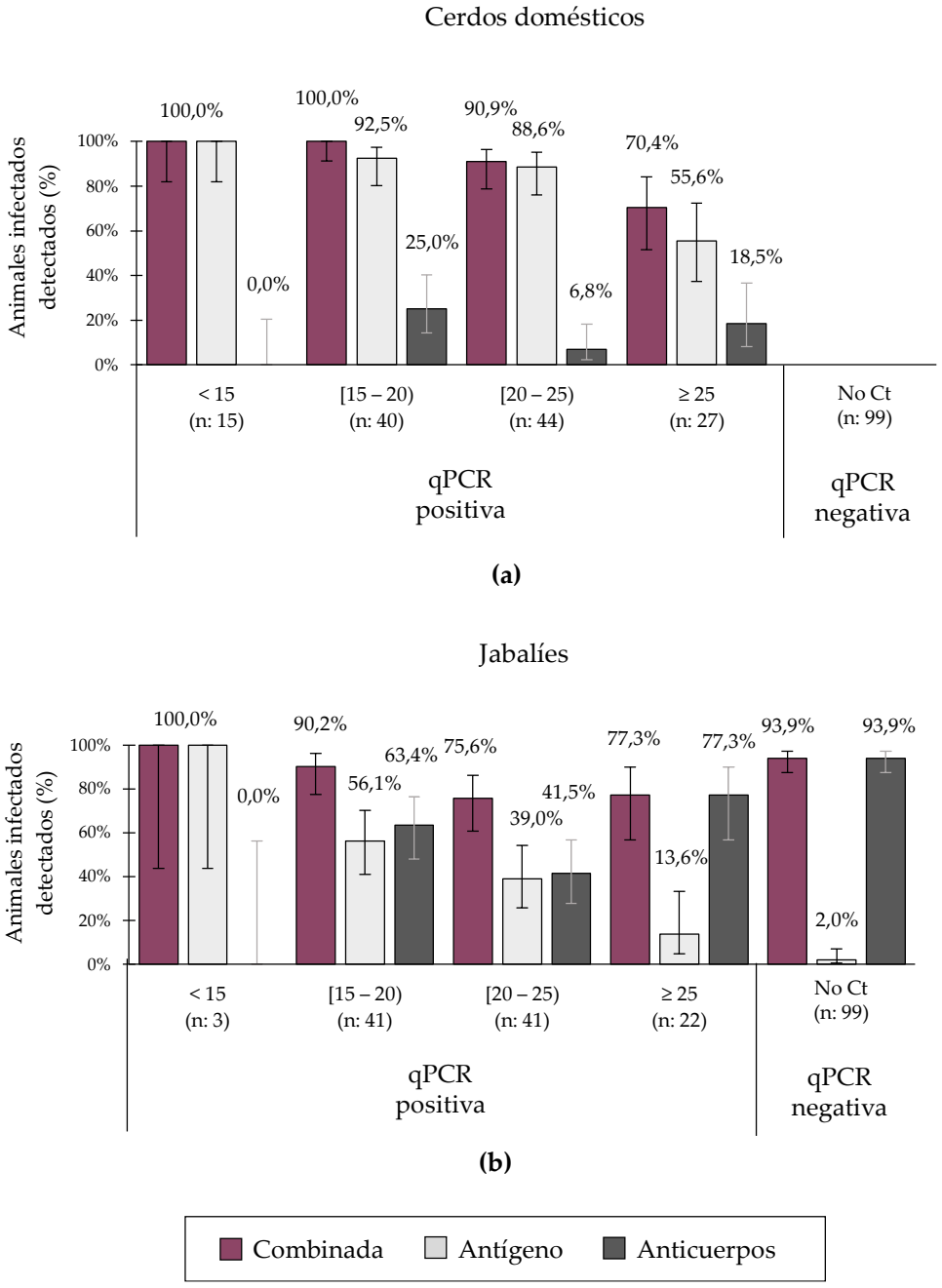
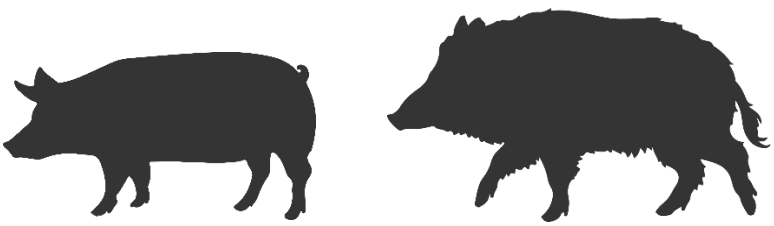


Figura IV.49. Análisis de muestras de sangre en el ensayo INgezim® ASFV Combo CROM Ag/Ab, agrupadas por animal. **(a)** Muestras procedentes de cerdos domésticos; **(b)** muestras procedentes de jabalíes. En cada gráfica, el eje de ordenadas muestra el porcentaje de animales positivos detectados con la tira de antígeno, o anticuerpo, o en la detección combinada de ambas tiras. En el eje de abscisas, se agrupan las muestras según el valor de Ct obtenido en qPCR de rutina.

Por último, para determinar la **especificidad diagnóstica del ensayo** Combo, se analizó un total de 193 muestras procedentes de animales no infectados, recogidas en las mismas zonas. Con estas muestras, el ensayo mostró un valor de especificidad global del 97,4 % [IC 95 %: 94,1–98,9 %], siendo del 98,0 % [IC 95 %: 93,0–99,5 %] para muestras procedentes de cerdos domésticos (n: 100) y del 96,8 % [IC 95 %: 91,0–98,9 %] para muestras recogidas de jabalíes (n: 93). Los resultados falsos positivos se obtuvieron únicamente en la tira de detección de antígeno, siendo 3 de ellos de muestras procedentes de jabalíes, y otros 2 de muestras procedentes de cerdos domésticos.

CAPÍTULO V DISCUSIÓN



El control de la PPA requiere el desarrollo de una vacuna eficaz y segura. Actualmente, no existe ninguna vacuna aprobada para su uso en la UE, puesto que las opciones comerciales disponibles no cumplen con los estándares establecidos [31,87]. Entre estos requisitos, destaca que el candidato vacunal presente propiedades DIVA. Como ya se ha visto en el control de otras enfermedades [115], la importancia del diagnóstico DIVA se agudiza en zonas donde está presente el patógeno, además de ser esencial en el mantenimiento del estatus de libre de enfermedad. Sin embargo, hasta la fecha, las vacunas desarrolladas frente al vPPA solo han permitido un diagnóstico DIVA a nivel molecular [111,112].

Con este objetivo, dentro del proyecto VACDIVA, se han generado y evaluado distintos candidatos vacunales, basados en la deleción de uno o más genes del vPPA Lv17/WB/Rie1, un aislado naturalmente atenuado de genotipo II. En el presente trabajo, se ha trabajado con los genes B119L, EP153R y/o EP402R como marcadores negativos, puesto que ya estaba descrito que su deleción causaba la atenuación de otras cepas del virus [159]. Sin embargo, a día de hoy, no se conocen en profundidad las propiedades inmunogénicas de sus productos génicos. De manera simultánea, los genes reporteros eGFP y/o mCherry se han empleado como marcadores positivos en las vacunas candidatas [147,148].

Dichas vacunas deben estar acompañadas de **ensayos de diagnóstico que permitan distinguir los animales infectados de los vacunados**. En este contexto, el objetivo principal de la presente tesis doctoral ha sido el desarrollo de un ensayo serológico DIVA, complementario a las vacunas desarrolladas en el proyecto europeo VACDIVA. Para alcanzar este objetivo, el primer paso consistió en **producir los reactivos clave necesarios para el desarrollo de los inmunoensayos**, entendiendo como tales, principalmente, las proteínas codificadas por los genes marcadores negativos y positivos. Estas proteínas se expresaron de forma recombinante y, tras comprobar su antigenicidad, se evaluaron como antígenos DIVA para su uso en los inmunoensayos a desarrollar.

La **proteína 9GL**, codificada por el gen B119L, se expresó en el sistema de ***E. coli*** con distintas etiquetas (His-9GL (*E. coli*) y GST-9GL). Pese a implementar estrategias para mejorar la solubilidad de la proteína, como reducir la temperatura de expresión o añadir la etiqueta GST [160], esta se obtuvo en todos los casos en la fracción celular insoluble, de donde fue solubilizada y purificada (Figura IV.2). Estudios previos mostraron que la proteína 9GL unida a GST era soluble y funcional [122,123], lo que sugiere que la insolubilidad observada en el presente estudio

podría deberse al uso de un promotor más fuerte, pudiendo inducir sobrecarga metabólica y formación de agregados de la proteína (cuerpos de inclusión). Para evaluar la antigenicidad de la proteína, se analizaron muestras de suero negativas y positivas, procedentes de animales experimentales infectados con el vPPA, en ELISA indirecto y *western blot*. Sin embargo, no se consiguió obtener una señal diferencial entre las muestras negativas y positivas analizadas en los ensayos, frente a ninguna de las versiones recombinantes (Figura IV.4.a). La ausencia de esta señal diferencial no puede atribuirse a proteínas contaminantes o a la etiqueta empleada, ya que se obtuvieron señales más altas frente a la proteína 9GL que frente al antígeno negativo empleado que había sido producido en las mismas condiciones.

Como consecuencia de estos resultados, se expresó la proteína 9GL en un sistema eucariótico (**células de insecto**), His-9GL (Sf9), para intentar conseguir una proteína soluble y, por tanto, más parecida a la proteína viral que se expresa en el suido durante la infección del vPPA. Sin embargo, a pesar de optimizar las condiciones de la expresión, no se consiguió obtener la proteína soluble. Los agregados se lograron solubilizar, pero el comportamiento en ELISA indirecto y *western blot* fue equivalente al obtenido con las formas recombinantes expresadas en el sistema de *E. coli* (Figura IV.4.b).

Por tanto, ninguna de las formas y purificaciones obtenidas de la proteína 9GL resultó ser antigénicamente activa. Al no haber estudios previos disponibles sobre la antigenicidad de esta proteína, no se puede determinar si los resultados obtenidos en el presente trabajo se deban a que no se ha producido una proteína con estructura similar a la nativa, o a que la proteína viral no desencadena una respuesta inmune humoral suficiente para ser considerada como antígeno en un inmunoensayo.

Asimismo, las señales detectadas en el ELISA frente a la proteína 9GL en las muestras negativas experimentales, recogidas antes de la inmunización (día 0), no pueden atribuirse a factores intrínsecos de la matriz analizada, ya que estas señales no se reprodujeron en los sueros negativos provenientes de animales de campo (Figura IV.4). Por otro lado, estos mismos sueros se analizaron posteriormente con otros antígenos producidos en los mismos sistemas de expresión, sin detectarse problemas de señales inespecíficas. Estos resultados sugieren que las señales detectadas a día 0 podrían proceder de la secuencia específica de la proteína 9GL. Sin embargo, se requieren más estudios y/o datos adicionales sobre el estado y la cría de los animales experimentales, para poder llegar a una explicación de estos

resultados. Por todas estas razones, se descartó el uso de la proteína 9GL como antígeno DIVA en los inmunoensayos.

A continuación, se produjo la **pEP153R de genotipo II** por ser el genotipo de la cepa parental, Lv17/WB/Rie1, de las vacunas candidatas. Se expresó el dominio extracelular, ya que se había descrito que algunos residuos del dominio citoplasmático, localizado en el extremo amino-terminal, podrían estar implicados en la retención de la proteína en el retículo endoplasmático [22]. Además, se prescindió también del dominio transmembrana para facilitar su secreción.

Puesto que la secuencia presentaba sitios potenciales de glicosilación [34], se seleccionó el sistema de expresión de **células de mamífero** para conseguir una proteína lo más parecida posible a la proteína nativa. Se empleó el vector pCMV6-AC-FC-S para agregar un péptido señal y favorecer la secreción de la proteína al medio extracelular [161]. Además, se añadió la diana de la proteasa TEV entre la proteína y la etiqueta Fc, para permitir escindir la etiqueta en el caso de que esta interfiriera en el desarrollo de los inmunoensayos. La proteína resultante, pEP153R II-TEV-Fc, se detectó en el medio de cultivo y, como cabía esperar, se observó una banda a una masa molecular mayor de la predicha teóricamente y de aspecto difuso, típica de proteínas glicosiladas (Figura IV.6).

La antigenicidad de la pEP153R II-TEV-Fc se demostró en ELISA indirecto y *western blot* (Figura IV.8). Concretamente, se utilizaron sueros procedentes de animales infectados con aislados del vPPA de genotipo II, Lv17/WB/Rie1, Es16/WB-Viru8, Pol18/WB/Case1794 y Lv17/WB/Rie14/Tukuma5; así como de genotipo I, NH/P68, OURT 88/3, E75 y Benin 97/1-Δ148R. De este modo, se detectó seroconversión frente a la proteína en animales infectados con los aislados de genotipo II, a diferentes tiempos a partir de los 21 dpi (Figura IV.9.a). El nivel de anticuerpos específicos frente a la proteína se mantuvo hasta la última muestra analizada, a los 90 días tras la seroconversión. Sin embargo, se observó que la seroconversión frente a la pEP153R estaba retrasada aproximadamente dos semanas respecto a la respuesta que se producía frente a la proteína control, p72, una de las más inmunogénicas del virus. Esto podría explicarse porque la p72 es una proteína estructural que constituye aproximadamente el 30 % de la masa del virión [162], mientras que la pEP153R ha sido localizada en el retículo endoplasmático mediante expresión heteróloga [22]. En caso de que esta localización subcelular de la pEP153R se reprodujera en los suidos infectados con el

vPPA, sería necesario más tiempo para la exposición de los péptidos de la proteína en el MHC-II, retrasándose así la activación de los linfocitos B y, por tanto, la secreción de anticuerpos específicos frente al antígeno. Aunque investigaciones previas parecían indicar que la pEP153R no era capaz de inducir una respuesta humoral en una infección del vPPA [99], estudios recientes habían indicado su capacidad para desencadenar anticuerpos [163]. No obstante, los datos presentados en este trabajo de tesis doctoral representan el primer análisis de la cinética de anticuerpos específicos que se generan frente a la pEP153R, utilizando, además, sueros de diferentes aislados.

Por otro lado, no se detectó señal frente a la pEP153R II-TEV-Fc en las muestras procedentes de animales infectados con los aislados de genotipo I o XXIII (Figura IV.9.b y c). Por tanto, parece que las diferencias observadas en las secuencias de aislados de genotipo I y II (Figura IV.5), podrían traducirse en la ausencia de antigenicidad cruzada entre genotipos. En el caso del genotipo I, este resultado se confirmó posteriormente cuando se analizaron muestras de campo procedentes de animales de la isla de Cerdeña, recogidas en 2022 y caracterizadas como virus de genotipo I (n: 46). Ninguna de estas muestras, caracterizadas previamente como positivas en el ensayo INgezim® PPA Compac, dio un resultado positivo frente a la pEP153R-TEV-Fc, reafirmando así que no hay reactividad cruzada entre los anticuerpos generados en infecciones con aislados de genotipo I y II frente al antígeno pEP153R. Este resultado podría representar una limitación en los territorios donde circulan cepas del vPPA pertenecientes a genotipos diferentes al genotipo II.

A pesar de los resultados prometedores con el antígeno pEP153R-TEV-Fc, el rendimiento de la expresión no fue compatible con su uso en un ensayo de diagnóstico comercial, aunque el gen sintético había sido optimizado automáticamente para su expresión en el sistema de mamífero [164]. Como se describió en los resultados, al lograr un alto rendimiento en la expresión de la pEP153R de genotipo I y, considerando la similitud entre ambas proteínas, se llevó a cabo un estudio exhaustivo de su secuencia de nucleótidos, analizando la proporción de los codones en el gen. Una nueva optimización del gen EP153R de genotipo II utilizando la misma proporción de tripletes, dio lugar a un rendimiento en la expresión de la proteína 30 veces mayor. A continuación, se comprobó que la forma optimizada (pEP153R II-Fc) presentaba un comportamiento equivalente en cuanto a antigenicidad, en comparación a la proteína anteriormente expresada (pEP153R II-TEV-Fc) (Figura IV.11), por lo que eliminar la diana TEV no afectaba la

antigenicidad. Este aumento del rendimiento de la expresión de la proteína permite su uso como antígeno en un inmunoensayo comercial, así como inmunógeno para la generación de AcM específicos. Estos AcM permitirían no solo el desarrollo de nuevos formatos de ensayos diagnósticos, sino también llevar a cabo un estudio de la localización nativa de la pEP153R en las células infectadas.

De manera similar, se expresó el dominio extracelular de la **pEP153R de genotipo I** en células de mamífero, obteniéndose una proteína altamente glicosilada y con un rendimiento elevado (Figura IV.12). Sin embargo, cuando se evaluó la antigenicidad de la proteína utilizando sueros procedentes de animales infectados con diferentes aislados de genotipo I, NH/P68, OURT 88/3, E75 y Benin 97/1-Δ148R, únicamente se detectaron anticuerpos específicos en los animales infectados con los aislados E75 y Benin 97/1-Δ148R (Figura IV.13).

En el alineamiento múltiple (Figura IV.5.b), se había observado que la pEP153R de los aislados NH/P68 y OURT 88/3 no presentaba parte de la región amino-terminal de la proteína, faltando la totalidad de la región citoplasmática y más de la mitad de los residuos aminoacídicos del dominio transmembrana. La ausencia de estas secuencias, donde el péptido señal suele estar localizado [165], podría estar implicada en la falta de antigenicidad de la pEP153R en estos dos aislados, ya que impediría que la proteína siguiese la ruta del retículo endoplasmático. Este hecho podría tener un efecto directo en la localización de la proteína en la célula infectada o el virión, así como influir en su inmunogenicidad al no estar glicosilada [166]. Además, no se puede establecer una relación clara entre la longitud de la proteína y la atenuación del virus, ya que, aunque ambos virus con la versión corta de la pEP153R son atenuados, NH/P68 y OURT 88/3 [59,105,167], la forma larga está presente en cepas altamente virulentas, tales como L60 y E70, así como en cepas atenuadas como BA71V [168]. Por tanto, serían necesarios más estudios para establecer si existe una correlación entre la forma de la proteína y su antigenicidad y/o la atenuación del virus, pudiendo resultar útil la producción de AcM frente a la proteína para determinar su localización subcelular en infecciones *in vitro* con los diferentes aislados.

Posteriormente, se produjo la proteína viral **CD2v**, codificada por el gen EP402R. Debido a la complejidad de la proteína y a los sitios potenciales de glicosilación que presenta su secuencia, se escogieron sistemas eucariotas en células de insecto y de mamífero para su expresión heteróloga. Para ello, se seleccionó la

secuencia codificante del dominio extracelular, ya que es la región de la proteína más expuesta en el virión y, además, para facilitar la expresión del antígeno.

En el caso de la expresión en células de insecto, el gen se clonó en dos plásmidos de expresión diferentes, pAcHLTA y pAcGP67. El primer plásmido se utilizó para su expresión intracelular, empleando células Sf9, mientras que el segundo, agregó la secuencia señal de la proteína GP64 de baculovirus, para conseguir su expresión extracelular en células Sf900. En la infección de las células con el baculovirus AcHLTA/EP402R, se detectó la proteína His-CD2v (Sf9) únicamente en la FI del extracto celular, observándose una banda del tamaño esperado y dos bandas adicionales de mayor tamaño (Figura IV.16.b). Estas dos últimas bandas no se identificaron con el suero policlonal de referencia, positivo a anticuerpos anti-vPPA (Figura IV.16.c). Por tanto, probablemente correspondan a agregados de la proteína que no han llegado a disgregarse con el SDS, en lugar de formas glicosiladas. Finalmente, la proteína se consiguió solubilizar con sarcosilo (Figura IV.16.d), pero debido a la alta concentración (2,5 %) que se tuvo que utilizar para conseguir su completa solubilización, no fue posible su purificación posterior en una columna de afinidad.

En el caso de la expresión con el baculovirus recombinante AcGP67/EP402R, la proteína obtenida, His-CD2v (Sf900), también se detectó solamente en la FI de las células infectadas (Figura IV.15). En este caso, se detectó una banda de mayor masa molecular a la teórica, característica de proteínas glicosiladas y descrita en trabajos previos [120]. Sin embargo, el hecho de que la proteína no saliera del retículo podría ser explicado por una saturación del sistema de endomembranas, a pesar de haber trabajado con mdi bajas que aseguran una infección lenta.

En cuanto a la producción de la CD2v en células de mamífero (CD2v-Fc), se empleó el vector pCMV6-AC-FC-S para su secreción al medio extracelular. La proteína se obtuvo glicosilada, pero el rendimiento fue muy bajo y las estrategias seguidas para aumentar el rendimiento no fueron exitosas. Estudios previos donde han conseguido obtener la proteína CD2v en el medio extracelular, no proporcionan datos sobre el rendimiento de la producción [169–172]. Una alternativa, basada en evidencias anteriores con otras proteínas, podría ser la expresión de la CD2v con la etiqueta Fc en el extremo amino-terminal [173], o trabajar en la optimización de codones, como se consiguió con la pEP153R anteriormente descrita. Por otro lado, los estudios de cinética de expresión indicaron que los mayores rendimientos se obtuvieron trascurridos 4 días y la señal correspondiente a la proteína desaparecía

después de este tiempo. Este resultado puede ser debido al efecto de las proteasas que pueden encontrarse en las células HEK [174]. Así, un estudio de los posibles sitios activos de proteasas en la secuencia de la proteína CD2v podría llevar a una mejora en la acumulación de la proteína.

Posteriormente, al estudiar la antigenicidad de las proteínas His-CD2v (Sf9) y CD2v-Fc, se observó que frente a esta segunda forma de la proteína había una mayor señal diferencial entre los sueros negativos y positivos analizados en animales inmunizados con el aislado Es16/WB-Viru8 (genotipo II) (Figura IV.17). Este resultado puede deberse a que la CD2v-Fc, al ser soluble, probablemente presente un plegamiento más parecido al de la proteína nativa y, además, sus glicosilaciones pueden tener un efecto directo en el reconocimiento de los anticuerpos generados frente a la CD2v durante la infección [171]. Por otro lado, al evaluar la respuesta humoral en muestras procedentes de infecciones con el aislado Lv17/WB/Rie1, no se detectó señal frente a la CD2v (Figura IV.18.b). Este aislado, a pesar de ser de genotipo II, presenta una forma truncada de la proteína, faltando parte del dominio extracelular, y la totalidad de la región transmembrana e intracelular (Figura IV.14.b). En este caso, aunque la proteína podría seguir la ruta del retículo para su glicosilación y secreción al tener el péptido señal, se podría ver alterado su anclaje en la membrana externa del virión y, por tanto, su inmunogenicidad. Como se esperaba, tampoco se detectaron anticuerpos específicos en los animales infectados con aislados del vPPA de genotipo I (NH/P68) o genotipo XXIII (ET13/1504) (Figura IV.18.c y d), debido a las diferencias observadas en el alineamiento de las secuencias (Figura IV.14.a). Sin embargo, es necesario resaltar que la CD2v del aislado NH/P68 presenta una proteína sin el péptido señal, por lo que el resultado podría ser específico de este aislado en concreto y no se podría extrapolar a otras versiones de la proteína dentro del genotipo I. Por tanto, aunque en este trabajo no se hayan llevado a cabo, hacen falta más estudios para llegar a una conclusión sobre la antigenicidad cruzada del antígeno en infecciones con otros genotipos del vPPA. Para ello, podría ser de ayuda la localización de la proteína CD2v en cultivos celulares primarios infectados con los distintos aislados del vPPA aquí estudiados.

Por último, es importante destacar que, aunque algunos estudios han propuesto el uso de la proteína CD2v como antígeno DIVA [119], su aplicación podría presentar algunas dificultades. Por un lado, en China se han identificado numerosos aislados con este gen mutado [64] y, en el presente estudio, así como en estudios recientes, se ha demostrado que esto puede tener un efecto directo en la

respuesta inmune humoral frente a la proteína [120]. Además, se ha observado que el antígeno podría estar presente en el suero de los animales infectados [175], lo que podría interferir con los resultados del diagnóstico.

Respecto a los **marcadores positivos**, en las vacunas prototipos se emplearon las proteínas reporteras eGFP y mCherry. El uso de estas proteínas marcadoras puede ser ventajoso frente a otros tipos de marcajes, puesto que tienen origen marino, lo que les confiere diferencias antigénicas con proteínas de microorganismos y animales terrestres, evitando la reactividad cruzada. Asimismo, presentan gran estabilidad, al tener estructuras de barril beta, facilitando su conservación en los ensayos, sobre todo en condiciones de campo. Por otro lado, se ha visto que estas proteínas no inducen patogenicidad en los cerdos domésticos y jabalíes [147], pero tampoco en otro tipo de ganado, como el ovino [176].

La proteína **eGFP** se produjo en el sistema de expresión en *E. coli* y células de insecto, obteniendo tres versiones recombinantes: His-eGFP (*E.* coli), GST-eGFP (*E. coli)* y His-eGFP (Sf9). En ambos sistemas, la proteína se obtuvo en la fracción celular soluble y se purificó por cromatografía de afinidad, con buenos niveles de pureza (Tabla IV.4). La antigenicidad de las tres versiones recombinantes de la proteína se probó mediante ELISA indirecto, detectándose señal frente a los tres antígenos (Figura IV.21.a) y, en ningún caso, frente a los antígenos negativos, confirmando que dicha señal era específica frente a la eGFP. Adicionalmente, la antigenicidad fue comprobada mediante *western blot*, corroborando que los anticuerpos se unían específicamente a la proteína GST-eGFP (Figura IV.21.b). Dado que las tres versiones de la proteína, His-eGFP (*E. coli*), GST-eGFP e His-eGFP (Sf9), presentaban un comportamiento similar en los inmunoensayos en cuanto a antigenicidad, se seleccionó la versión de la proteína GST-eGFP por presentar el rendimiento de expresión más alto (Tabla IV.4). Este resultado se puede deber a que la etiqueta GST promueve la solubilidad de las proteínas, respecto a otros péptidos cortos, como el 6xHis, aumentando así la cantidad que se recupera en la producción [160]. De este modo, aunque había algunos estudios previos que sugerían la antigenicidad de la eGFP en cerdos [136,137], el presente trabajo de tesis doctoral supone la primera evaluación de su capacidad antigénica en el contexto de una vacunación con un vPPA modificado y su potencial uso como diana diagnóstica de tipo DIVA.

A continuación, se expresó la proteína **mCherry** en células de *E. coli* y de insecto. En ambos sistemas, la proteína se obtuvo en la fracción celular soluble, seguido de una purificación por afinidad, obteniendo buenos niveles de pureza en las dos versiones recombinantes, His-mCherry (*E. coli*) e His-mCherry (Sf9) (Figura IV.22 y Figura IV.23, respectivamente). La antigenicidad de las proteínas se probó mediante ELISA indirecto utilizando tres muestras de suero procedentes de un animal vacunado con una vacuna prototipo con el gen mCherry como marcador positivo (Figura IV.24.a). Los resultados obtenidos mostraron señales específicas similares frente a ambas proteínas. Por otro lado, en el análisis de muestras negativas, solo se observaron diferencias en la señal obtenida con uno de los 66 sueros analizados (Figura IV.24.b). En consecuencia, es necesario evaluar un mayor número de muestras positivas para determinar cuál de las versiones de la proteína es la más adecuada para alcanzar los mejores parámetros diagnósticos; si bien, *a priori*, ambas podrían emplearse como antígeno en el inmunoensayo. El presente estudio supone la primera comprobación de que la proteína mCherry es reconocida por anticuerpos específicos que se producen durante la inmunización de cerdos domésticos con vacunas que contienen este gen como marcador positivo y, por tanto, podría ser potencialmente empleada como antígeno DIVA.

Para continuar el desarrollo de los inmunoensayos, se decidió seleccionar la proteína eGFP. Esta decisión estuvo basada en tres motivos: (1) los prototipos vacunales más prometedores que se estaban evaluando *in vivo* en el proyecto tenían insertado el gen eGFP; (2) las vacunas frente a las diferentes enfermedades porcinas que están actualmente disponibles en el mercado no presentan este marcador [177]; y (3) la proteína mCherry ha sido empleada como marcador positivo en las vacunas frente al vPPA cuyo uso ha sido aprobado en algunos países [112], aunque su aplicación como diana DIVA no se ha estudiado hasta ahora.

Además de la producción de proteínas recombinantes, también se generaron **anticuerpos monoclonales frente al antígeno eGFP**, por ser también herramientas fundamentales en el desarrollo de inmunoensayos diagnósticos. En el presente trabajo, se aislaron cinco líneas de hibridoma estables productoras de AcM anti-eGFP de isotipo IgG1, denominadas 8D2E3, 5A6D2, 3F7D4, 8G7A7 y 4A2E5. Es necesario señalar que en el cribado de hibridomas únicamente se seleccionaron los productores de IgG, ya que, además de ser líneas más estables, las IgG son las inmunoglobulinas más específicas por su antígeno en contraposición a las IgM que

son moléculas con una avidez muy elevada pero una menor especificidad [178,179] y, por tanto, menos recomendadas para el desarrollo de los inmunoensayos. Además, la estructura monomérica de las IgG, facilita el marcaje de las mismas si fuera necesario.

Los AcM se caracterizaron mediante *western blot* y ELISA de competición (Tabla IV.5). De los resultados obtenidos en la primera técnica, se puede inferir que los tres AcM con los que se obtuvo señal positiva, 3F7D4, 8G7A7 y 5A6D2 reconocen epítopos lineales, mientras que los otros dos, 8D2E3 y 4A2E5, presumiblemente reconocerían epítopos conformacionales. Por otro lado, los epítopos reconocidos por las parejas de AcM 5A6D2-3F7D4 y 8G7A7-4A2E5 mostraron un solapamiento en el ELISA de competición. De este modo, puesto que los epítopos reconocidos por los AcM 3F7D4 y 5A6D2 presentarían una conformación lineal, ambos podrían tratarse del mismo, o bien, podrían estar próximos en la estructura primaria de la proteína, interfiriendo así en la unión antígeno-anticuerpo por impedimentos estéricos. Contrariamente, el epítopo reconocido por la pareja de AcM 8G7A7-4A2E5 no puede ser el mismo, ya que uno de los AcM resultó negativo en *western blot*. Por tanto, se puede deducir que, o bien, los epítopos de ambos AcM están próximos entre sí, interfiriendo así en la unión por impedimentos estéricos, o que la unión del AcM 8G7A7 produce un cambio conformacional que afecta al epítopo reconocido por el AcM 4A2E5, o viceversa. Estos AcM fueron utilizados como reactivos en la puesta a punto del LFA eGFP, que se discute más adelante. Además, los cinco AcM generados podrían utilizarse en el desarrollo de un ensayo de ELISA de competición altamente específico, o podrían ser muy útiles en la detección directa de la cepa vacunal mediante la técnica de inmunofluorescencia directa, usada para el diagnóstico en los laboratorios de referencia.

Una vez analizada la antigenicidad de las proteínas recombinantes en muestras de animales infectados o vacunados frente al vPPA, se desarrollaron y optimizaron dos **ELISA indirectos con fines de diagnóstico DIVA**, cada uno de ellos para la detección de anticuerpos frente a la pEP153R de genotipo II (marcador negativo) o frente a la proteína reportera eGFP (marcador positivo).

En primer lugar, los nuevos ensayos fueron evaluados con un total de 495 muestras de suero procedentes de animales experimentales y recogidas a distintos días tras la inmunización. En concreto, 115 de cerdos domésticos infectados con Lv17/WB/Rie1, 198 de cerdos domésticos vacunados, así como 77 procedentes de

jabalíes infectados con la cepa parental y 96 de jabalíes vacunados. La seroconversión frente a la proteína control p72 (marcador constitutivo), se comprobó en todos los animales con el ensayo comercial INgezim® PPA Compac, demostrando así la correcta inmunización frente al virus o la vacuna candidata.

Respecto a los animales infectados con el virus parental, Lv17/WB/Rie1, el 100 % de los mismos, seroconvirtió frente a la pEP153R, aunque con un retraso en la aparición de anticuerpos de aproximadamente 2 semanas, respecto a la seroconversión frente a la p72 (Figura IV.29.a y Figura IV.31.a). En todos los casos, el nivel de anticuerpos se mantuvo estable hasta la última muestra recogida. Sin embargo, la respuesta pareció ser más heterogénea respecto a la detectada frente a la p72, lo que puede ser una consecuencia implícita de la diferencia en el inicio de ambas respuestas, ya que las señales positivas se vuelven más uniformes con el tiempo. Además, la respuesta humoral frente a las tres dianas del ensayo DIVA fue más homogénea en cerdos domésticos (Figura IV.30) que en jabalíes (Figura IV.32). Las diferencias entre ambos animales podrían deberse a que, en el caso de los jabalíes, se analizaron conjuntamente dos dosis diferentes de inmunización, lo que podría haber aumentado la variabilidad en las respuestas. Esto es consistente con observaciones previas que indican que la aparición de anticuerpos está relacionada con la dosis utilizada [56,58–60]. Asimismo, como era esperable, todas las muestras de los animales infectados fueron negativas a la eGFP (marcador positivo).

Por otro lado, todos los animales vacunados con los prototipos vacunales, Lv17/WB/Rie1-ΔEP, Lv17/WB/Rie1-ΔCD y Lv17/WB/Rie1-ΔCD-UK, que contenían el gen EP153R como marcador negativo y el gen eGFP como marcador positivo, resultaron negativos frente a la pEP153R hasta el último día analizado (54 dpv), incluso después del desafío con Arm07, una cepa virulenta de genotipo II (Figura IV.29.b y Figura IV.31.b). Sin embargo, cuando se analizaron los sueros recogidos en el momento del sacrificio, a los 32 o 38 días después del desafío, se observó que aparecían anticuerpos frente al antígeno pEP153R en los dos animales vacunados en los que el virus Arm07 se había detectado a días más tempranos en la qPCR DIVA (datos del EURL no publicados). Por tanto, este resultado parece indicar que, cuando un animal vacunado entra en contacto con el vPPA, la aparición de anticuerpos frente a la pEP153R depende de forma directa de la capacidad de replicación del virus virulento en el animal. Además, todos los animales vacunados produjeron un nivel alto de anticuerpos frente a la eGFP, mantenido hasta la última muestra analizada. El perfil de anticuerpos frente a la eGFP fue muy similar al

detectado frente a la proteína control, p72, con una diferencia en el tiempo de inicio de 4 ± 4 días para los cerdos domésticos y de 5 ± 3 días en el caso de los jabalíes.

Considerando en conjunto todas las muestras de suero descritas en esta primera evaluación de los ensayos, se obtuvo una **sensibilidad analítica global** del ELISA pEP153R del 75,3 %, siendo estadísticamente mayor la sensibilidad detectada en cerdos domésticos que en jabalíes, para muestras recogidas a más de 30 dpi. Esta diferencia podría ser debida a la ruta de inmunización de la vacuna (intramuscular y oral, respectivamente), como ya se había observado en otras ocasiones [59]. En cambio, la sensibilidad del ELISA eGFP fue del 90,0 %, no mostrando diferencias significativas entre ambas especies. Asimismo, la **especificidad** de ambos ensayos fue del 99,9 %, considerando 139 muestras procedentes de animales experimentales y 384 de campo, de las que 234 procedían de jabalíes salvajes, así como 161 muestras positivas a otras enfermedades porcinas. De este modo, los resultados indican que los ensayos desarrollados no muestran reactividad cruzada con anticuerpos producidos frente a otras enfermedades porcinas como, Mal Rojo, Aujeszky, PPC o tuberculosis, y mantienen una buena especificidad incluso con muestras de jabalíes que, en ocasiones, debido a su mal estado de conservación, pueden dar lugar a una disminución de la especificidad de los ensayos.

Por tanto, los parámetros diagnósticos obtenidos muestran que los **antígenos pEP153R de genotipo II y eGFP son buenos marcadores serológicos**. Si bien, es necesario destacar que las propiedades antigénicas de la eGFP solo han sido evaluadas con muestras de animales inmunizados con candidatos vacunales con el mismo contexto genético y una atenuación similar (Tabla III.10). Por otro lado, en los animales analizados, los ensayos ELISA basados en dichos antígenos son precisos y presentan gran valor diagnóstico, ya que permitirían **distinguir a los animales infectados de los vacunados** tanto en explotaciones de cerdos domésticos, como en animales silvestres vacunados oralmente. Este último resultado es fundamental para la erradicación de la PPA en la epidemia euroasiática actual, debido al papel del jabalí en la transmisión del virus [180].

Además de muestras de suero, también se evaluó el posible uso de **muestras alternativas** en los inmunoensayos, considerando como tales, muestras de sangre líquida (recogidas con EDTA), sangre recogida en papel de filtro y tejido. En este caso, como ensayo control se empleó el INgezim® ASFV-R, basado en la detección de anticuerpos frente a la p30. Para el cálculo de los parámetros diagnósticos, se

utilizaron como referencia los resultados obtenidos en el ELISA pEP153R y el ELISA eGFP, con las muestras pareadas de suero. Para todos los tipos de muestras alternativas analizadas, la **especificidad** obtenida con todas las matrices fue del 100,0 % en ambos ensayos, salvo en el ELISA pEP153R, en el que se detectó 1 falso positivo de las 250 sangres líquidas negativas analizadas, resultando, aun así, en un valor de especificidad en este grupo de muestras del 99,6 %. La alta especificidad que mostraron ambos inmunoensayos, tiene gran relevancia en el diagnóstico de la PPA, ya que llevar a cabo una técnica de diagnóstico confirmatorio tiene un coste alto y levanta falsas alarmas en los países afectados [78].

En cuanto a la **sensibilidad** en muestras alternativas, se observó que, con la matriz de **sangre líquida**, no se detectaban aquellas muestras cuyos sueros pareados eran positivos débiles en el ELISA pEP153R y en el ELISA eGFP. Este efecto en la sensibilidad se había visto en estudios previos [78], debido a las características intrínsecas de esta matriz, ya que los anticuerpos están más concentrados en el suero [181]. El uso de sangre en el inmunoensayo DIVA podría facilitar la recogida de muestras en campo, ya que se podría utilizar la misma matriz para el diagnóstico directo e indirecto.

Respecto a las **sangres recogidas en discos de papel**, se detectaron 7 positivos más en comparación a los sueros pareados detectados en el ELISA pEP153R, sin ser la diferencia obtenida estadísticamente significativa. Este resultado puede explicarse porque, al ser una muestra menos compleja, se utilizó aproximadamente 10 veces más cantidad, respecto a las muestras de suero. Por el contrario, en el ELISA eGFP se perdió la mitad de las muestras positivas detectadas con suero. Sin embargo, es necesario el análisis de un mayor número de muestras para evaluar de forma más precisa la disminución de la sensibilidad observada y así analizar si es necesario ajustar el ensayo para mejorar los parámetros diagnósticos y el posible uso del ELISA eGFP con este tipo de muestras. Esta evaluación sería relevante ya que, la sangre en discos de papel es un tipo de recogida de muestras prometedora, al no requerir personal especializado, pudiendo así simplificar considerablemente la toma de muestras por parte de los cazadores. Además, es un método económico que permite la conservación de la misma hasta su llegada al laboratorio, sin necesidad de una cadena de frío [68].

Por último, se analizó la **sensibilidad** de los ensayos con **muestras de tejidos** (Tabla IV.12). En el ELISA pEP153R, los tejidos que resultaron positivos correspondieron a aquellos procedentes de animales cuyas muestras de suero

pareadas también habían sido positivas en el momento del sacrificio. En concreto, todos los tejidos procedentes de animales infectados resultaron positivos, excepto por las muestras correspondientes al diafragma. Este resultado tiene concordancia con estudios anteriores en los que se había observado que este tipo de exudados presentaba menor sensibilidad respecto a las muestras de suero [182]. Por otro lado, en las muestras de tejido de los animales vacunados, aquellas procedentes de órganos altamente irrigados también fueron positivas, coincidiendo con las correspondientes a los dos animales cuyos sueros pareados habían resultado también positivos en el ELISA pEP153R. Estos tejidos presentaron una señal positiva débil (M-CN ≤ 0,9), por lo que el título de anticuerpos probablemente termine alcanzando valores positivos en el resto de órganos transcurrido más tiempo desde la infección del animal.

Respecto al ELISA eGFP, todos los órganos pareados a las muestras de suero positivas dieron también un resultado positivo en el ensayo, manteniendo una concordancia perfecta entre los dos tipos de matrices. El uso de muestras de tejido en el diagnóstico de la PPA resulta de gran utilidad en la vigilancia activa en mataderos. La médula ósea, en particular, se trata de una muestra valiosa en animales en descomposición, ya que puede conservar material viral durante largos períodos, permitiendo no solo la detección mediante PCR, sino también la detección de anticuerpos [25]. Por tanto, el uso de estas muestras facilita una respuesta diagnóstica más completa en el campo, contribuyendo a la vigilancia epidemiológica de la PPA, sobre todo en áreas donde los jabalíes actúan como reservorios de la enfermedad.

Por tanto, aunque es necesario el análisis de un mayor número de muestras alternativas positivas, sobre todo para determinar más precisamente el uso de muestras de sangre recogidas en discos de papel en el ELISA eGFP, se puede concluir que los parámetros diagnósticos preliminares del inmunoensayo DIVA con este tipo de matrices son prometedores. Además, sería interesante evaluar otras muestras alternativas que evitasen el sacrificio de los animales, como fluidos oronasales, de garganta u orales, recogidos mediante la masticación de cuerdas o el uso de hisopos, ya que han demostrado ser de utilidad en el diagnóstico [183–185]. Sin embargo, hay que tener en consideración que las cargas virales en estas matrices suelen ser más bajas en comparación con la sangre, sueros y tejidos, por lo que se podría ver afectada la sensibilidad del ensayo de cribado, con un aumento de falsos negativos.

Una vez evaluados los ELISA pEP153R y eGFP con muestras experimentales, estos se adaptaron a un **formato comercial**. Se evaluó la reproducibilidad y repetibilidad de los ensayos, así como su caducidad, obteniendo resultados compatibles con su uso comercial.

El ensayo adaptado al formato comercial se envió para su evaluación a diferentes laboratorios de referencia de distintos países de Europa, en zonas donde la PPA ha estado presente en la última epidemia. De esta forma, el ensayo se **validó con un amplio panel de muestras procedentes de animales de campo**, recogidas dentro del programa de vigilancia que se lleva a cabo en las explotaciones de cerdos domésticos, así como en las poblaciones de jabalíes salvajes (Tabla IV.13). En el análisis, se incluyó un total de 791 muestras de suero, 849 muestras de sangre (recogida con EDTA) y 713 muestras de diferentes tejidos. Este estudio incluyó un mayor número de muestras positivas procedentes de jabalíes, puesto que, además de que en Europa la prevalencia de la enfermedad es mayor en la especie salvaje, en las explotaciones hay un control exhaustivo de los síntomas [55].

Los resultados de los ensayos llevados a cabo en los distintos laboratorios fueron recogidos y analizados en conjunto para determinar la sensibilidad diagnóstica del ELISA pEP153R, así como la especificidad de ambos ensayos, ELISA pEP153R y ELISA eGFP (Figura IV.33). Los valores de **especificidad** en ambos casos fueron muy altos, obteniendo un 98,7 % para el ELISA pEP153R de un total de 1619 muestras analizadas, mientras que para el ELISA eGFP, considerando como negativas todas las muestras analizadas (n: 2353), la especificidad fue del 99,9 %. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras de cerdo doméstico y jabalí para este parámetro en ninguno de los dos ensayos; además, ninguna de las matrices tuvo un efecto negativo sobre la especificidad.

Sin embargo, sí se observaron diferencias significativas en el parámetro de **sensibilidad del ELISA pEP153R**, ya que se obtuvo un valor del 7,8 % con muestras procedentes de cerdos domésticos y del 46,5 % para muestras de jabalíes. Debido a esto, se realizó un análisis más detallado con las muestras positivas, no solo clasificándolas por tipo de animal, sino también por tipo de matriz, para analizar el posible impacto de ambas variables sobre este parámetro.

En primer lugar, se analizaron las **muestras positivas procedentes de jabalíes**. En este caso, al clasificar las muestras por tipo de matriz (Figura IV.34), se observó

una mayor sensibilidad en las muestras de suero y sangre, respecto a las muestras de tejidos. Al no disponer de muestras pareadas de suero, no fue posible determinar si la baja sensibilidad detectada en las muestras de tejido se debía a una incompatibilidad del ensayo con este tipo de matriz. Es posible que la conservación y la calidad de las muestras hayan interferido en los resultados o que, alternativamente, los animales no hubieran desarrollado aún anticuerpos frente a la pEP153R, ya que las muestras podrían haberse recogido a tiempos más tempranos posinfección. Para llegar a una conclusión definitiva, es necesario analizar muestras de tejido positivas débiles de animales experimentales, para así determinar si la sensibilidad del ensayo es comparable a la observada en las muestras de suero.

Asimismo, es importante señalar que, para todas las matrices, la sensibilidad del ELISA pEP153R se calculó utilizando como ensayo de referencia la detección de anticuerpos frente a una proteína control (p72/p30). Puesto que esta comparativa estaría sesgada debido al retraso detectado en los animales experimentales entre las dos respuestas serológicas y, con la intención de mitigar esta diferencia, se realizó un análisis de los datos en mayor profundidad. Para ello, se determinó la **sensibilidad del ELISA pEP153R, agrupando las muestras positivas de suero y sangre según su título en la técnica confirmatoria IPT** (Figura IV.35). Así, se observó que la sensibilidad del ensayo aumentaba a medida que el título de IPT era más alto, entendiendo que, un mayor título indica que han pasado más días desde que el animal entró en contacto con el vPPA. La diferencia de sensibilidad detectada para los títulos más altos de IPT entre las dos matrices fue estadísticamente significativa, siendo mayor en muestras de sueros (82,1 % vs 51,1 % en suero y sangre, respectivamente), y guardando concordancia con lo que se había observado previamente en las muestras experimentales.

Con el mismo objetivo, se estudió la sensibilidad del ELISA pEP153R **agrupando las muestras positivas a anticuerpos frente a la proteína control, según el resultado obtenido en la qPCR de rutina** (Figura IV.36). Esta qPCR está basada en la detección del gen B646L, que codifica la proteína p72. Dado que las muestras eran positivas en el ELISA control, un valor de Ct más alto significaba una menor carga viral en la muestra y, por tanto, que la infección estaba más avanzada. En este análisis, solo se incluyeron muestras de sangre por no haber ningún suero caracterizado en las dos técnicas. De esta forma, se observó que la sensibilidad del ELISA pEP153R aumentaba proporcionalmente con el valor de Ct, teniendo correlación con el resultado observado en las muestras experimentales, donde la sensibilidad del ensayo aumentaba a mayor tiempo posinfección. Por otro lado, en

las muestras negativas en el ensayo qPCR, se observó una sensibilidad menor respecto a los dos grupos de muestras positivas de Ct [25–3) y Ct ≥ 30. Este resultado podría ser debido a que en estas regiones están circulando cepas atenuadas del vPPA, dificultando la correlación del valor de Ct y el momento en el que se ha producido la infección. Esto influiría en la sensibilidad del ELISA pEP153R, no pudiendo ser correlacionada con el valor de Ct detectado. Estos resultados también pueden ser explicados porque el título de anticuerpos específicos frente a la pEP153R disminuye con el tiempo, aunque los datos obtenidos en este trabajo muestran que el título de anticuerpos se mantiene en las infecciones experimentales, al menos, hasta 3 meses después de la seroconversión (Figura IV.9.a).

Para resaltar la importancia de **combinar las pruebas DIVA serológicas y moleculares**, los datos también se analizaron combinando los resultados serológicos y de detección de material genético mediante qPCR. En este caso, a pesar de que estaba puesta a punto la qPCR DIVA [186], que detecta las mismas tres dianas que la prueba DIVA serológica, las muestras únicamente estaban caracterizadas por la qPCR de rutina. Se consideró un total de 832 muestras de jabalíes infectados cuya caracterización por ambas técnicas estaba disponible. Estas muestras se clasificaron según el resultado obtenido en los ensayos serológicos basados en las proteínas control (p72, p30), seguido de la caracterización por el ELISA pEP153R y, finalmente, el resultado obtenido en la qPCR de rutina de los laboratorios oficiales que, como ya se ha mencionado anteriormente, está basada en la detección del gen B646L. De este modo, se obtuvieron 5 grupos (Figura IV.37), que se describen a continuación:

(1) El primer grupo, compuesto por el 32,1 % de las muestras, fue negativo a anticuerpos frente al vPPA y positivo en la qPCR, por lo que la diferenciación entre los animales infectados y vacunados vendría dada únicamente por la qPCR DIVA. Estas muestras fueron recogidas antes de que los animales desencadenaran una respuesta inmune humoral frente al virus, correspondiendo probablemente a los primeros 10 días después del contacto con el virus. Por tanto, el uso de la qPCR DIVA es esencial en estos casos.

(2) En un segundo grupo, constituido por el 10,2 % de las muestras, los animales infectados se pueden diferenciar de los vacunados mediante ambos ensayos DIVA, molecular y serológico. Estas muestras probablemente correspondan a formas agudas o subagudas de la enfermedad, causadas por cepas

de virulencia moderada, ya que ha dado tiempo a la seroconversión frente a la pEP153R.

(3) El tercer grupo estuvo formado por el 20,3 % de muestras analizadas. En este caso, todas fueron negativas en qPCR y los animales infectados se pueden diferenciar de los vacunados únicamente utilizando el ensayo DIVA serológico. Por tanto, estas muestras correspondan posiblemente a formas clínicas subagudas o crónicas de la patología.

(4) El cuarto grupo, compuesto por el 13,0 % de las muestras, correspondió a animales que desarrollaron anticuerpos frente a la proteína control y no frente a la pEP153R. Este resultado podría indicar que los animales presentaron una forma clínica aguda o subaguda de la patología, quedando el diagnóstico DIVA reducido a nivel molecular.

(5) El último grupo estuvo formado por el 24,4 % de las muestras, siendo negativas tanto a nivel serológico en el ELISA pEP153R, como a nivel molecular en la qPCR de rutina, mientras que fueron positivos en el ensayo serológico frente a la proteína control. Esta situación también podrá darse en los animales vacunados, durante la ventana de tiempo entre la seroconversión frente a la proteína control y la eGFP, por lo que no sería posible el diagnóstico diferencial.

En los grupos 4 y 5 se observa cómo la ventana de tiempo detectada en los animales experimentales entre la seroconversión frente a la proteína control, altamente inmunogénica, y la pEP153R, podría tener un impacto negativo en el diagnóstico DIVA de los animales. En el caso del grupo 4, esto se vería solventado por el diagnóstico a nivel molecular. Sin embargo, en el grupo 5, donde el perfil de resultados fue: ELISA control positivo, ELISA pEP153R negativo y qPCR de rutina negativa, la detección serológica resultaría fundamental para la diferenciación entre los animales infectados y vacunados. Para estudiar el **impacto de los resultados de este último grupo** en la precisión del diagnóstico DIVA, se identificó el mismo perfil de resultados en el total de muestras analizadas procedentes de **jabalíes vacunados** experimentalmente (Figura IV.38). En las 65 muestras procedentes de los animales experimentales, se observó que un 44,6 % (n: 29) cumplía con el mismo perfil diagnóstico, pero en este caso, se pudo considerar el resultado obtenido en el tercer ELISA del ensayo serológico DIVA, el ELISA eGFP. Así, 26 de las 29 muestras totales, resultaron positivas en este último ELISA, reduciéndose las muestras con diagnóstico ambiguo a solo un 4,6 % (n: 3). Este resultado mostró que la detección

de anticuerpos frente a las tres dianas ofrece un diagnóstico serológico DIVA preciso, en combinación con el diagnóstico molecular. Durante los próximos meses, se llevará a cabo en el proyecto VACDIVA un estudio de vacunación en campo con un mayor número de animales, que será crítico para la validación final del ensayo serológico DIVA.

Para reducir esta ventana del 4,6 % en la que no se podría hacer un diagnóstico DIVA, siendo más significativa en el intervalo de 10 a 20 días después de la vacunación, se podría desarrollar otro formato del ELISA eGFP que alcanzase una sensibilidad mayor. Este podría el caso de un ensayo de competición, en el que se detectaría, además de anticuerpos de isotipo IgG, anticuerpos de isotipo IgM, que se producen al inicio de la infección. Para ello, se podrían analizar los AcM anti-eGFP desarrollados en el presente trabajo como potenciales herramientas en este ensayo. Otra alternativa sería trabajar con un formato de ELISA de doble reconocimiento, en el que el antígeno actúa en el ensayo como molécula capturadora y reveladora, por lo que también se detectan anticuerpos de isotipo IgM y, además, éstos amplifican la señal porque pueden unir varias moléculas del antígeno marcado.

Por otro lado, se observó que la sensibilidad del ELISA pEP153R en muestras procedentes de **cerdos domésticos** de campo, fue menor que la detectada en muestras de jabalíes, sin observarse diferencias entre las matrices analizadas. Sin embargo, este resultado puede verse afectado por el hecho de que el número de muestras positivas analizadas frente a la proteína control fue bastante menor (n: 51) en comparación a las muestras analizadas de jabalí (n: 637), y solo 26 de ellas presentaban un título de IPT mayor que 5.000. Además, un 98 % de las muestras positivas a PPA consideradas, eran positivas en la qPCR de rutina (Figura IV.39). Por tanto, estos resultados indican que en las explotaciones de cerdos domésticos se realiza un control de los síntomas que permite una detección más temprana de la infección. Este hecho resulta en una menor detección de muestras positivas frente al antígeno pEP153R en comparación con la proteína de control, debido al retraso en la seroconversión observado entre ambas respuestas en los animales experimentales.

Dado los resultados obtenidos y el análisis de los datos, se puede afirmar que el ensayo serológico DIVA desarrollado y validado en esta tesis doctoral, es una buena herramienta que podría acompañar a una vacuna frente a la PPA en la que se incorporase el antígeno pEP153R como marcador negativo y la proteína reportera eGFP como marcador positivo. Un ejemplo de ello sería el candidato vacunal Lv17/WB/Rie1-Δ153-Δ402 u otros candidatos derivados de este, cuyo uso ha sido patentado recientemente por sus resultados prometedores [147]. De este modo, el ensayo DIVA acompañante podría incluirse en la vigilancia de la PPA, en regiones geográficas de Europa, América y Asia, donde la vacuna vaya a ser aplicada, ya que la mayoría de los aislados del virus que circulan en esos territorios corresponden a cepas de genotipo II.

Cabe destacar que el uso del **marcador negativo (pEP153R)** tiene relevancia para la detección de cepas de vPPA que puedan circular en granjas vacunadas y así, continuar siendo declaradas libres de la enfermedad a pesar de la vacunación. Por otro lado, también tendría relevancia el uso de este marcador en estudios epidemiológicos en zonas endémicas donde la vacuna vaya a ser aplicada. Incluyendo en los estudios un número adecuado de muestras, se podría establecer si la prevalencia de anticuerpos frente a la pEP153R disminuye con la aplicación de la vacuna, permitiendo así el seguimiento de la erradicación de la enfermedad. Por otro lado, se ha comprobado que el **marcador positivo (eGFP)** resulta útil en la monitorización de la inmunización de los animales vacunados tanto domésticos como salvajes. En el caso de las poblaciones porcinas, sería recomendable realizarlo a partir de los 20 días después de la vacunación para evitar un diagnóstico ambiguo. Además, el estudio serológico resulta esencial en las campañas de vacunación, puesto que las vacunas producen una viremia baja que desaparece generalmente a partir de los 20 dpv, mientras que los niveles de anticuerpos frente a la eGFP permanecen elevados hasta, al menos, los 54 dpv, permitiendo así un diagnóstico diferencial más prolongado en el tiempo.

Por último, los datos presentados en el presente trabajo ponen de manifiesto la importancia de combinar el diagnóstico DIVA directo e indirecto para detectar todas las formas clínicas de la enfermedad que se pueden ver en campo, como ocurre en la vigilancia convencional. Por tanto, es crucial que las campañas de vacunación vayan acompañadas de una vigilancia adecuada, basada en el uso de ambos ensayos DIVA.

Puesto que el primer diseño del diagnóstico DIVA supone el análisis de cada muestra en tres ELISA independientes, siendo un proceso de análisis laborioso, se adaptó el ensayo a una **plataforma de diagnóstico múltiple**. Este tipo de tecnología permite detectar la presencia de anticuerpos frente a varios antígenos diana de forma simultánea, lo cual reduce el trabajo y el tiempo necesario para obtener un resultado, así como la variabilidad asociada a ensayos independientes. Por otra parte, el volumen necesario de muestra es menor, lo cual supone una gran ventaja en situaciones en las que dicho volumen es limitante [144,187]. En este contexto, se optimizó un ensayo séxtuple basado en la tecnología ELISA-*microarray* para la detección simultánea de anticuerpos frente a los antígenos p72, p30, pEP153R de genotipo II y eGFP. Además, se incluyó otro antígeno del vPPA, la proteína pEP153R de genotipo I, para poder identificar infecciones causadas por aislados de genotipo I, que han sido detectados recientemente en China [188]. Por último, se añadió la proteína E2 del vPPC, debido a que es también una enfermedad porcina de declaración obligatoria ante la OMSA, con lesiones *post mortem* indistinguibles a la PPA [1]. Esto hace que sea necesario un diagnóstico en el laboratorio para la diferenciación de ambas enfermedades.

Para la puesta a punto del ensayo múltiple, se utilizaron muestras de suero positivas procedentes de animales infectados o vacunados experimentalmente, así como muestras de suero negativas procedentes de animales de campo. La detección de anticuerpos en el ensayo múltiple frente a las proteínas p72 y p30 mostró un comportamiento similar a los ELISA individuales para ambos antígenos, teniendo una concordancia perfecta con el ensayo INgezim® ASFV-R y perdiendo solo 2 muestras positivas débiles detectadas en el INgezim® PPA Compac (Figura IV.46.a y Figura IV.46.b). Sin embargo, el ensayo múltiple detectó una muestra positiva en la técnica confirmatoria IPT, que había sido negativa en el INgezim® PPA Compac. Por tanto, se puede considerar que, para los antígenos p72 y p30, la especificidad del ensayo múltiple fue del 100,0 % y la sensibilidad varió entre el 96,6 % y el 100,0 %. Además, se detectó que 1 de las muestras positivas a anticuerpos frente a la p72 en el ensayo múltiple fue negativa a anticuerpos anti-p30; mientras que 4 negativas a la p72 resultaron positivas a anticuerpos frente a la p30. Este resultado muestra que incluir ambos antígenos en el ensayo múltiple aumenta el rango de epítopos específicos del vPPA y permite mejorar la sensibilidad del ensayo, como ya se había descrito previamente [158].

Respecto al antígeno pEP153R de genotipo II, se obtuvieron buenos parámetros diagnósticos utilizando el ELISA como referencia, resultando en una

especificidad del 99,6 % y una sensibilidad del 92,9 %, no detectándose únicamente 1 muestra positiva débil (Figura IV.46.c). Por otro lado, el antígeno eGFP en el ensayo múltiple mostró los mismos parámetros diagnósticos que el ELISA eGFP (Figura IV.46.d). Por lo que, aunque es necesario el análisis de un mayor número de muestras positivas para obtener valores de sensibilidad estadísticamente representativos, se ha observado una gran correlación entre los ensayos individuales y el ensayo múltiple para ambos antígenos.

Respecto al antígeno pEP153R de genotipo I incluido en el diagnóstico DIVA múltiple, se detectaron las 4 muestras positivas de las que se disponía, caracterizadas en el ELISA indirecto para la detección de anticuerpos frente a la pEP153R de genotipo I. Sin embargo, sería necesario el análisis de un mayor número de muestras positivas para determinar la sensibilidad del ELISA-*microarray* frente a este antígeno. Por otro lado, se evaluó un total de 232 muestras negativas, sin detectarse ningún resultado falso positivo, asegurando así una buena especificidad del ensayo. En cuanto a la proteína E2 (Figura IV.46.e), la sensibilidad del ensayo múltiple fue del 100,0 %, y la especificidad resultó en un valor del 96,8 %, debido a que se obtuvieron 7 falsos positivos en las 217 muestras negativas incluidas, que habían resultado negativos en el ensayo de referencia INgezim® CSF Compac. Estas 7 muestras procedían de cerdos negros de Nebrodi (raza autóctona de Sicilia) de la misma granja. La reactividad detectada probablemente no se deba a la reactividad cruzada descrita entre el vPPC y otros pestivirus [189], ya que en el análisis de la especificidad del ensayo séxtuple se incluyeron muestras de animales experimentales infectados con BDV y BVDV, sin generar resultados falsos positivos. No obstante, no se puede descartar que el antígeno E2 en el ensayo múltiple presente inespecificidades frente a otros virus, pudiendo ser especialmente significativas en la raza Nebrodi, debido a que estos animales pastorean en condiciones semisalvajes o salvajes, pudiendo constituir un sistema complejo de múltiples coinfecciones [190]. En resumen, son necesarios más estudios para determinar si los falsos positivos detectados son causados por una granja puntual, una raza de cerdos o son estadísticamente representativos en el diagnóstico general.

De este modo, se ha conseguido adaptar el ensayo DIVA a una tecnología múltiple. Esta tecnología se aplica ampliamente en salud humana [191], pero se ha realizado un menor número de estudios en el ámbito veterinario. Esto se debe en parte a que se trata de una tecnología más costosa y a que la optimización de un ELISA-*microarray* es un proceso de mayor complejidad, en comparación a un ELISA convencional. A pesar de esto, en el presente trabajo, se ha conseguido desarrollar

un ensayo múltiple con parámetros equivalentes a los obtenidos en los ELISA individuales, siendo necesario el análisis de un mayor número de muestras positivas frente a los antígenos pEP153R genotipo II, eGFP, E2 y, en especial, frente al antígeno pEP153R de genotipo I, para determinar de forma más precisa los parámetros diagnósticos de cada uno de los antígenos incluidos en el ensayo múltiple. Además, sería interesante analizar otro tipo de matrices por las ventajas que presentan, como se ha discutido anteriormente, así como muestras procedentes de infecciones reales en campo. El uso de este nuevo ensayo séxtuple ayudaría en gran medida a los planes de vigilancia, permitiendo la ejecución de un único ensayo para el cribado diferencial DIVA frente a la PPA y la diferenciación entre la PPA y PPC, en un panel de muestras. Este último diagnóstico diferencial resulta especialmente importante, ya que se han notificado brotes de ambas enfermedades en el este de Europa durante las últimas décadas, aumentando así la probabilidad de encontrar ambos virus en una misma zona geográfica [150,158].

Adicionalmente, este ELISA-*microarray* supone un punto de partida para el desarrollo de un nuevo ensayo mejorado que en el futuro pueda incluir analitos de otras enfermedades de interés de la industria porcina. Así como la posibilidad de añadir la proteína pEP153R de otros genotipos que puedan circular en regiones donde la vacuna vaya a ser aplicada o en zonas donde la recombinación del virus empiece a tener mayor relevancia [188,192]. Además, en el caso de que fuera de interés, se podrían incluir otros antígenos reporteros que se utilizaran en otras vacunas frente al vPPA, como la proteína mCherry. Por otro lado, se podrían incluir otros antígenos del vPPC, tales como la proteína Erns, que permitiesen el diagnóstico DIVA de esta enfermedad, siendo especialmente relevante en el caso de una epidemia. Por tanto, el ensayo múltiple desarrollado puede tener gran interés y aplicación para facilitar el cribado DIVA de las muestras y podría ayudar a los planes de prevención y control de ambas enfermedades.

Por otra parte, es fundamental en el control de la PPA la detección temprana de animales infectados, mediante la identificación de los síntomas en campo y un diagnóstico específico en el laboratorio. En algunas circunstancias, no es viable procesar y realizar a tiempo la caracterización de las muestras utilizando los ensayos de diagnóstico descritos en el Manual Terrestre de la OMSA [7]. Por tanto, la capacidad de realizar pruebas *in situ* permite implementar medidas de control y prevenir la propagación de la enfermedad de manera inmediata. Esto es

especialmente importante en entornos con recursos limitados, donde no es fácil llevar a cabo un diagnóstico laboratorial o enviar las muestras con las medidas de bioseguridad y la cadena de frío necesarias para su conservación [81]. Las **pruebas rápidas** son pruebas sencillas cuya interpretación es visual y no requieren de personal altamente cualificado para su realización.

En el presente trabajo, se han desarrollado pruebas rápidas basadas en la **tecnología LFA**, siguiendo un formato de doble reconocimiento. Los ensayos de doble reconocimiento son pruebas sensibles, pero también ofrecen otras ventajas adicionales, comentadas anteriormente, debido a que utiliza el antígeno diana como molécula reveladora en lugar de un anticuerpo anti-IgG de una especie. Por otro lado, se trata de un ensayo multiespecie y, por tanto, permite el reconocimiento de anticuerpos en muestras de suero procedentes de suidos y otras especies animales. La tecnología LFA permitiría desarrollar un ensayo DIVA para incluir las tres dianas en una única tira de inmunocromatografía o utilizar un formato que incluya varias tiras en un mismo dispositivo. Por todo esto, se adaptó el ensayo DIVA a una plataforma de ensayo rápido.

En primer lugar, se desarrolló el **LFA para la detección de anticuerpos frente al antígeno eGFP**. El primer paso en el desarrollo fue la selección de la versión recombinante de la proteína eGFP más adecuada para este tipo de ensayo. En este caso, la proteína GST-eGFP, expresada en *E. coli*, se seleccionó como reactivo revelador y capturador, por presentar mejor comportamiento respecto a los otros dos antígenos, His-eGFP (*E. coli*) y His-eGFP (Sf9). Esto podría deberse a que la etiqueta GST actúa como chaperona de la proteína a la que está fusionada [193,194]. Otra alternativa podría ser que la GFP forma dímeros [195] y, a su vez, la dimerización se puede ver favorecida por la etiqueta GST [196]. Por tanto, podría haber epítopos conformacionales en el candidato vacunal que solo puedan ser vistos por la versión recombinante GST-eGFP, resultando en mejores parámetros diagnósticos.

Con el ensayo prototipo optimizado, se analizaron 9 muestras de suero positivas procedentes de animales vacunados experimentalmente, siendo 3 de ellas positivas débiles en el ELISA eGFP. Además, se incluyeron 249 muestras de suero negativas, de las cuales 141 procedían de animales experimentales y 108 de animales de campo de zonas libres de PPA, algunos de ellos con anticuerpos frente a otras enfermedades/vacunas porcinas que no contienen el gen eGFP. El análisis de los datos derivó en un valor de sensibilidad del 100,0 % y una especificidad del 98,8 %,

detectándose únicamente 3 falsos positivos. De este modo, aunque es necesario analizar un mayor número de muestras positivas para predecir un valor de sensibilidad estadísticamente significativo, se ha obtenido un ensayo con una sensibilidad equivalente al ELISA eGFP con las muestras analizadas hasta ahora, así como una buena especificidad, comparable a otros ensayos rápidos del mercado [81].

Respecto al **LFA pEP153R** para la detección de anticuerpos frente al antígeno pEP153R de genotipo II, no se consiguió obtener un ensayo con unos parámetros diagnósticos adecuados, ya que no fue posible aumentar la señal de las muestras positivas respecto a la obtenida con las muestras negativas. En este contexto, se intentó aumentar la señal específica frente al antígeno ajustando la velocidad del flujo capilar mediante la disminución del tamaño de poro de la membrana, ya que, al ralentizarlo, se aumenta el tiempo de contacto de los anticuerpos de la muestra con el antígeno, pudiendo favorecer así la cinética de reconocimiento y, por tanto, la sensibilidad del ensayo [197]. Además, debido a que el método de inmovilización de la pEP153R sobre las nanopartículas puede influir en la estructura de la proteína y, en consecuencia, en el reconocimiento de los anticuerpos específicos, se cambiaron las condiciones de acoplamiento. Así, se probó otro tipo de unión a las partículas y se redujo la densidad de acoplamiento para evitar posibles efectos de hacinamiento causados por el tamaño de la proteína diana [198]. Sin embargo, ninguna de las estrategias para mejorar la sensibilidad fue exitosa. Por tanto, los resultados observados parecen indicar que la unión de los anticuerpos a esta versión recombinante de la proteína, pEP153R-Fc, no es compatible con las condiciones de los ensayos rápidos.

En paralelo, se obtuvo una baja especificidad en el LFA pEP153R. Esto podría deberse, en parte, a que el formato de un LFA no permite lavados, siendo más probable que se lleven a cabo interacciones de baja afinidad. Estas interacciones no se observaron cuando se aplicó únicamente el diluyente de muestra; por tanto, aunque se ha descrito que la pEP153R puede formar dímeros [22], este resultado descarta que se produzca una unión entre el antígeno del reactivo relevador y capturador. Para estudiar la posible causa de este efecto, se utilizó un antígeno negativo con etiqueta Fc, expresado y purificado de la misma forma que la proteína diana. Así, se observaron las mismas señales inespecíficas en la línea test del ensayo cuando se analizaron las muestras de suero negativas. Por tanto, las señales inespecíficas observadas podrían estar causadas por la etiqueta Fc. De este modo, se podría cortar la Fc de la proteína recombinante pEP153R II-TEV-Fc, utilizando la

proteasa del tabaco, para confirmar si el fondo detectado es producido por la etiqueta. En el caso de que no lo fuera, se podrían bloquear tanto los sitios libres de la membrana como los de las nanopartículas con otra proteína, como la BSA, para evitar las uniones inespecíficas o aquellas que presenten una constante de disociación baja.

De esta forma, aunque no se pudo desarrollar un LFA pEP153R, los parámetros diagnósticos obtenidos con el ensayo LFA eGFP permitirían el uso de este ensayo para la confirmación de la presencia de anticuerpos frente a la vacuna de forma temprana, rápida y fácil, siendo especialmente útil en áreas con recursos limitados. Además, se podría utilizar en compañía del ensayo INgezim® PPA CROM Anticuerpo, para incluir también la detección simultánea de anticuerpos frente a la proteína control p72. No obstante, es importante señalar que para que el procesamiento de la muestra a nivel de campo sea más sencillo y rápido, es necesario evaluar el compartimiento del ensayo con muestras de sangre. Esta evaluación no fue posible porque no había disponibilidad de este tipo de matriz en el momento de la puesta a punto del ensayo. Por otro lado, continúa siendo crucial el desarrollo de un ensayo rápido para la detección de la seroconversión frente al antígeno pEP153R, para así permitir una vigilancia más adecuada mediante un diagnóstico DIVA, al poder descartar posibles vPPA circulando en áreas vacunadas.

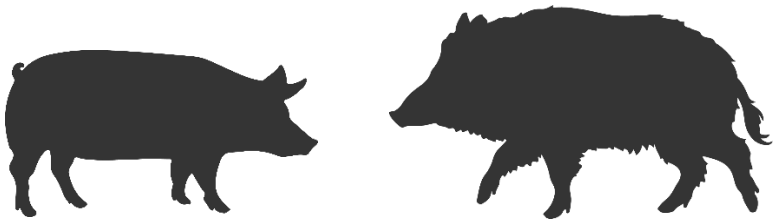
Por último, el **dispositivo de LFA de detección doble** que se describe en el presente trabajo ofrece una gran ventaja en el diagnóstico *in situ*, al permitir la detección simultánea de antígeno y anticuerpos frente al vPPA en una muestra dada. Esta estrategia de vigilancia combinada se ha empleado previamente para la erradicación de la PPA en ciertas zonas [199]. Sin embargo, hay que tener en cuenta que las pruebas rápidas en campo son un complemento útil, pero no reemplazan las técnicas de laboratorio dentro de los programas de control de la enfermedad [81]. Los resultados de la validación en campo demostraron la dependencia del tiempo de infección en las pruebas de detección directa e indirecta, tal y como se describió en la Figura I.3, siendo compatibles con trabajos previos [200]. Cuando la carga viral era elevada (Ct < 15), la tira de detección de antígeno identificó el 100 % de los animales infectados, que no presentaban anticuerpos. Por el contrario, a medida que la carga viral disminuía, la implementación del ensayo de detección combinada demostró una mayor eficacia, ya que se aumentó el porcentaje detectado de muestras positivas en todos los grupos analizados (Figura IV.48). Notablemente,

cuando no se detectó carga viral, la tira de detección de anticuerpos permitió la identificación de 93 muestras que habrían sido consideradas negativas si solo se hubieran analizado mediante el ensayo de detección de antígeno. Este resultado es de interés ya que los animales que han sobrevivido a la infección o han sido infectados con cepas de menor virulencia, podrían tener un papel en la transmisión del vPPA [7]. Sin embargo, se observó una mayor utilidad del ensayo combinado en muestras procedentes de jabalíes que en cerdo doméstico (Figura IV.49), lo que podría explicarse porque, en la vigilancia de los animales salvajes, a menudo se utilizan cadáveres cuya sangre recolectada suele estar coagulada, pudiendo llevar a una menor sensibilidad en la detección del antígeno viral. Además, podría verse influenciado porque en cerdos domésticos, la identificación de la PPA suele ser más rápida debido a la existencia de un control de los síntomas. Por tanto, la recogida temprana de las muestras da lugar a que los animales presenten altas cargas virales en sangre, sin haber desarrollado todavía una respuesta de anticuerpos.

Dado que los resultados del ensayo INgezim® ASFV Combo CROM Ag/Ab mostraron buenos parámetros diagnósticos en muestras obtenidas de cerdos domésticos y jabalíes, este método facilitaría el diagnóstico *in situ* de la enfermedad en ambas especies. Así, podría convertirse en una herramienta útil para el diagnóstico, respaldando la toma de decisiones a nivel local, especialmente en países donde la infraestructura de laboratorio es limitada o inexistente.

En conjunto, se ha desarrollado un ensayo serológico DIVA, basado en la detección de anticuerpos frente a una proteína control altamente inmunogénica, p72 y/o p30, así como frente a las proteínas pEP153R y eGFP. Este ensayo podría ser una herramienta útil en la vigilancia de la enfermedad en áreas donde se utilice una vacuna con el gen EP153R como marcador negativo y el gen eGFP como marcador positivo. Adicionalmente, el uso del ensayo séxtuple facilitaría la realización de un único procedimiento para la vigilancia DIVA en futuras campañas de vacunación. Asimismo, la combinación del LFA eGFP con la detección de anticuerpos frente a la p72 podría ser ventajosa para monitorizar la vacunación en granjas. Por último, los resultados obtenidos en la validación en campo del ensayo rápido combinado, para detectar antígeno viral y anticuerpos frente al vPPA, demostraron que se trata de una herramienta de gran ayuda en el control de la enfermedad, especialmente en animales salvajes.

CAPÍTULO VI CONCLUSIONES



1. Se ha demostrado que las proteínas pEP153R y eGFP son antígenos dianas que pueden ser utilizados en un ensayo diagnóstico serológico, tanto en cerdos domésticos como en jabalíes.

2. La detección de anticuerpos en una misma muestra frente a los antígenos pEP153R, eGFP y una proteína control (p72 y/o p30), junto con la qPCR DIVA, permite la diferenciación entre animales infectados y vacunados frente al vPPA, con candidatos vacunales que tengan el gen EP153R delecionado y el gen eGFP insertado.

3. El ensayo DIVA basado en la tecnología ELISA ha demostrado su potencial uso en la vigilancia y el control de la PPA, tanto en explotaciones porcinas como en jabalíes salvajes.

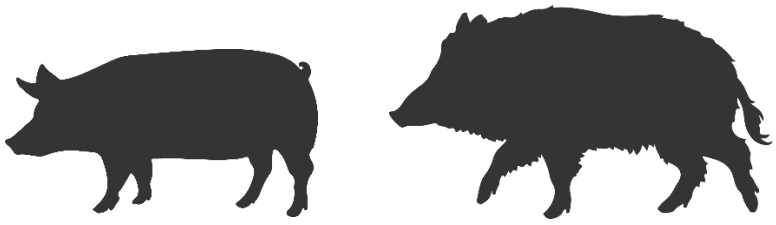
4. Se ha demostrado que los mejores parámetros diagnósticos del ELISA DIVA se obtienen con muestras de suero, aunque sería posible su uso con muestras alternativas, como sangre o tejido.

5. La adaptación del ELISA DIVA a un ensayo múltiple ELISA-*microarray*, que incluye un panel de 6 antígenos (p72, p30, pEP153R de genotipo I y II, eGFP y E2), permite no solo la diferenciación serológica entre animales infectados y vacunados frente al vPPA, sino también ofrece un diagnóstico más preciso de la enfermedad, así como la detección de anticuerpos frente al vPPC. Además, supone un punto partida para incorporar nuevos antígenos de otras cepas circulantes del vPPA, nuevas vacunas u otras enfermedades porcinas.

6. El LFA eGFP desarrollado, junto a la detección de anticuerpos frente a la proteína control p72, supone una herramienta útil para la comprobación sencilla y temprana en campo de la inmunización de animales vacunados.

7. El LFA de detección combinada de antígeno y anticuerpos frente al vPPA mejora la vigilancia rápida en campo de la enfermedad, siendo más relevante en animales salvajes.

CAPÍTULO VII BIBLIOGRAFÍA



1. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Peste Porcina Africana. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/peste-porcina-africana/peste_porcina_africana.aspx, accedido 01/07/2024.
2. Organización Mundial de Sanidad Animal. Código sanitario para los animales terrestres. **2024**. Acceso en línea: https://www.woah.org/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-codigo-terrestre/.
3. European Comission Agriculture and Rural Development - Farming (Pork). Disponible en: https://agriculture.ec.europa.eu/farming/animal-products/pork_en#introduction, accedido 01/08/2024.
4. Andrés, G.; Charro, D.; Matamoros, T.; Dillard, R.S.; Abrescia, N.G.A. The Cryo-EM Structure of African Swine Fever Virus Unravels a Unique Architecture Comprising Two Icosahedral Protein Capsids and Two Lipoprotein Membranes. *Journal of Biological Chemistry* **2020**, *295*, 1–12, doi:10.1074/jbc.AC119.011196.
5. Eustace Montgomery, R. On A Form of Swine Fever Occurring in British East Africa (Kenya Colony). *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics* **1921**, *34*, 159–191, doi:10.1016/S0368-1742(21)80031-4.
6. Yáñez, R.J.; Rodríguez, J.M.; Nogal, M.L.; Yuste, L.; Enríquez, C.; Rodriguez, J.F.; Viñuela, E. Analysis of the Complete Nucleotide Sequence of African Swine Fever Virus. *Virology* **1995**, *208*, 249–278, doi:10.1006/viro.1995.1149.
7. Organización Mundial de Sanidad Animal. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres. Capítulo 3.9.1. **2024**. Acceso en línea: https://www.woah.org/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/#ui-id-2.
8. Spinard, E.; Dinhobl, M.; Tesler, N.; Birtley, H.; Signore, A.V.; Ambagala, A.; Masembe, C.; Borca, M.V.; Gladue, D.P. A Re-Evaluation of African Swine Fever Genotypes Based on P72 Sequences Reveals the Existence of Only Six Distinct P72 Groups. *Viruses* **2023**, *15*, 2246, doi:10.3390/v15112246.
9. Dinhobl, M.; Spinard, E.; Tesler, N.; Birtley, H.; Signore, A.; Ambagala, A.; Masembe, C.; Borca, M.V.; Gladue, D.P. Reclassification of ASFV into 7 Biotypes Using Unsupervised Machine Learning. *Viruses* **2023**, *16*, 67, doi:10.3390/v16010067.
10. Gallardo, C.; Casado, N.; Soler, A.; Djadjovski, I.; Krivko, L.; Madueño, E.; Nieto, R.; Perez, C.; Simon, A.; Ivanova, E.; et al. A Multi Gene-Approach Genotyping Method Identifies 24 Genetic Clusters within the Genotype II-European African Swine Fever Viruses Circulating from 2007 to 2022. *Front. Vet. Sci.* **2023**, *10*, 1112850, doi:10.3389/fvets.2023.1112850.
11. Salas, M.L.; Andrés, G. African Swine Fever Virus Morphogenesis. *Virus Research* **2013**, *173*, 29–41, doi:10.1016/j.virusres.2012.09.016.
12. Alejo, A.; Matamoros, T.; Guerra, M.; Andrés, G. A Proteomic Atlas of the African Swine Fever Virus Particle. *J Virol* **2018**, *92*, e01293-18, doi:10.1128/JVI.01293-18.
13. Li, H.; Liu, Q.; Shao, L.; Xiang, Y. Structural Insights into the Assembly of the African Swine Fever Virus Inner Capsid. *J Virol* **2023**, *97*, e00268-23, doi:10.1128/jvi.00268-23.
14. García-Escudero, R.; Andrés, G.; Almazán, F.; Viñuela, E. Inducible Gene Expression from African Swine Fever Virus Recombinants: Analysis of the Major Capsid Protein P72. *J Virol* **1998**, *72*, 3185–3195, doi:10.1128/JVI.72.4.3185-3195.1998.
15. Andrés, G.; García-Escudero, R.; Simón-Mateo, C.; Viñuela, E. African Swine Fever Virus Is Enveloped by a Two-Membraned Collapsed Cisterna Derived from the

Endoplasmic Reticulum. *J. Virol.* **1998**, *72*, 8988–9001, doi:10.1128/JVI.72.11.8988-9001.1998.

16. Carrascosa, JoséL.; Carazo, JoséM.; Carrascosa, A.L.; García, N.; Santisteban, A.; Viñuela, E. General Morphology and Capsid Fine Structure of African Swine Fever Virus Particles. *Virology* **1984**, *132*, 160–172, doi:10.1016/0042-6822(84)90100-4.
17. Blome, S.; Franzke, K.; Beer, M. African Swine Fever – A Review of Current Knowledge. *Virus Research* **2020**, *287*, 198099, doi:10.1016/j.virusres.2020.198099.
18. Gallardo, M.C.; Reoyo, A.D.L.T.; Fernández-Pinero, J.; Iglesias, I.; Muñoz, M.J.; Arias, M.L. African Swine Fever: A Global View of the Current Challenge. *Porc Health Manag* **2015**, *1*, 21, doi:10.1186/s40813-015-0013-y.
19. Yang, S.; Miao, C.; Liu, W.; Zhang, G.; Shao, J.; Chang, H. Structure and Function of African Swine Fever Virus Proteins: Current Understanding. *Front. Microbiol.* **2023**, *14*, 1043129, doi:10.3389/fmicb.2023.1043129.
20. Chen, X.; Li, L.-F.; Yang, Z.-Y.; Li, M.; Fan, S.; Shi, L.-F.; Ren, Z.-Y.; Cao, X.-J.; Zhang, Y.; Han, S.; et al. The African Swine Fever Virus I10L Protein Inhibits the NF-κ B Signaling Pathway by Targeting IKK β. *J Virol* **2023**, *97*, e00569-23, doi:10.1128/jvi.00569-23.
21. Montoya, M.; Franzoni, G.; Pérez-Núñez, D.; Revilla, Y.; Galindo, I.; Alonso, C.; Netherton, C.L.; Blohm, U. Immune Responses against African Swine Fever Virus Infection. En Understanding and combatting African Swine Fever: A European perspective; Editoral Brill | Wageningen Academic, **2021**; pp. 63–71. ISBN 978-90-8686-910-7.
22. Hurtado, C.; Bustos, M.J.; Granja, A.G.; De León, P.; Sabina, P.; López-Viñas, E.; Gómez-Puertas, P.; Revilla, Y.; Carrascosa, A.L. The African Swine Fever Virus Lectin EP153R Modulates the Surface Membrane Expression of MHC Class I Antigens. *Arch Virol* **2011**, *156*, 219–234, doi:10.1007/s00705-010-0846-2.
23. Onisk, D.V.; Borca, M.V.; Kutish, S.; Kramer, E.; Irusta, P.; Rock, D.L. Passively Transferred African Swine Fever Virus Antibodies Protect Swine against Lethal Infection. *Virology* **1994**, *198*, 350–354, doi:10.1006/viro.1994.1040.
24. Oura, C.A.L.; Denyer, M.S.; Takamatsu, H.; Parkhouse, R.M.E. In Vivo Depletion of CD8+ T Lymphocytes Abrogates Protective Immunity to African Swine Fever Virus. *Journal of General Virology* **2005**, *86*, 2445–2450, doi:10.1099/vir.0.81038-0.
25. Gallardo, C.; Fernández-Pinero, J.; Arias, M. African Swine Fever (ASF) Diagnosis, an Essential Tool in the Epidemiological Investigation. *Virus Research* **2019**, *271*, 197676, doi:10.1016/j.virusres.2019.197676.
26. Kollnberger, S.D.; Gutierrez-Castañeda, B.; Foster-Cuevas, M.; Corteyn, A.; Parkhouse, R.M.E. Identification of the Principal Serological Immunodeterminants of African Swine Fever Virus by Screening a Virus cDNA Library with Antibody. *Journal of General Virology* **2002**, *83*, 1331–1342, doi:10.1099/0022-1317-83-6-1331.
27. Gallardo, C.; Blanco, E.; Rodríguez, J.M.; Carrascosa, A.L.; Sanchez-Vizcaino, J.M. Antigenic Properties and Diagnostic Potential of African Swine Fever Virus Protein Pp62 Expressed in Insect Cells. *J Clin Microbiol* **2006**, *44*, 950–956, doi:10.1128/JCM.44.3.950-956.2006.
28. Gómez-Puertas, P.; Rodríguez, F.; Oviedo, J.M.; Ramiro-Ibáñez, F.; Ruiz-Gonzalvo, F.; Alonso, C.; Escribano, J.M. Neutralizing Antibodies to Different Proteins of African

Swine Fever Virus Inhibit Both Virus Attachment and Internalization. *J Virol* **1996**, *70*, 5689–5694, doi:10.1128/jvi.70.8.5689-5694.1996.

29. Neilan, J.G.; Zsak, L.; Lu, Z.; Burrage, T.G.; Kutish, G.F.; Rock, D.L. Neutralizing Antibodies to African Swine Fever Virus Proteins P30, P54, and P72 Are Not Sufficient for Antibody-Mediated Protection. *Virology* **2004**, *319*, 337–342, doi:10.1016/j.virol.2003.11.011.
30. Silva, E.B.; Krug, P.W.; Ramirez-Medina, E.; Valladares, A.; Rai, A.; Espinoza, N.; Gladue, D.P.; Borca, M.V. The Presence of Virus Neutralizing Antibodies Is Highly Associated with Protection against Virulent Challenge in Domestic Pigs Immunized with ASFV Live Attenuated Vaccine Candidates. *Pathogens* **2022**, *11*, 1311, doi:10.3390/pathogens11111311.
31. Coelho Cruz, B., Toussaint, B., Munoz Pineiro, A., Mėhn, D., Denin, N., Ruiz Moreno, A. and Van Den Eede, G., African Swine Fever (ASF) vaccine development: progress and challenges. Publications Office of the European Union, Luxembourg, **2023**, doi:10.2760/209152, JRC134431.
32. Rodríguez, J.M.; Yáñez, R.J.; Almazán, F.; Viñuela, E.; Rodriguez, J.F. African Swine Fever Virus Encodes a CD2 Homolog Responsible for the Adhesion of Erythrocytes to Infected Cells. *Journal of Virology* **1993**, *67*, 5312–5320, doi:10.1128/JVI.67.9.5312-5320.1993.
33. Borca, M.V.; Kutish, G.F.; Afonso, C.L.; Irusta, P.; Carrillo, C.; Brun, A.; Sussman, M.; Rock, D.L. An African Swine Fever Virus Gene with Similarity to the T-Lymphocyte Surface Antigen CD2 Mediates Hemadsorption. *Virology* **1994**, *199*, 463–468, doi:10.1006/viro.1994.1146.
34. Galindo, I.; Almazán, F.; Bustos, M.J.; Viñuela, E.; Carrascosa, A.L. African Swine Fever Virus EP153R Open Reading Frame Encodes a Glycoprotein Involved in the Hemadsorption of Infected Cells. *Virology* **2000**, *266*, 340–351, doi:10.1006/viro.1999.0080.
35. Qu, H.; Ge, S.; Zhang, Y.; Wu, X.; Wang, Z. A Systematic Review of Genotypes and Serogroups of African Swine Fever Virus. *Virus Genes* **2022**, *58*, 77–87, doi:10.1007/s11262-021-01879-0.
36. Gómez-Villamandos, J.C.; Bautista, M.J.; Sánchez-Cordón, P.J.; Carrasco, L. Pathology of African Swine Fever: The Role of Monocyte-Macrophage. *Virus Research* **2013**, *173*, 140–149, doi:10.1016/j.virusres.2013.01.017.
37. Franzoni, G.; Graham, S.P.; Sanna, G.; Angioi, P.; Fiori, M.S.; Anfossi, A.; Amadori, M.; Dei Giudici, S.; Oggiano, A. Interaction of Porcine Monocyte-Derived Dendritic Cells with African Swine Fever Viruses of Diverse Virulence. *Veterinary Microbiology* **2018**, *216*, 190–197, doi:10.1016/j.vetmic.2018.02.021.
38. Hernaez, B.; Alonso, C. Dynamin- and Clathrin-Dependent Endocytosis in African Swine Fever Virus Entry. *J Virol* **2010**, *84*, 2100–2109, doi:10.1128/JVI.01557-09.
39. Galindo, I.; Cuesta-Geijo, M.A.; Hlavova, K.; Muñoz-Moreno, R.; Barrado-Gil, L.; Dominguez, J.; Alonso, C. African Swine Fever Virus Infects Macrophages, the Natural Host Cells, via Clathrin- and Cholesterol-Dependent Endocytosis. *Virus Research* **2015**, *200*, 45–55, doi:10.1016/j.virusres.2015.01.022.
40. Sánchez, E.G.; Quintas, A.; Pérez-Núñez, D.; Nogal, M.; Barroso, S.; Carrascosa, Á.L.; Revilla, Y. African Swine Fever Virus Uses Macropinocytosis to Enter Host Cells. *PLoS Pathog* **2012**, *8*, e1002754, doi:10.1371/journal.ppat.1002754.

41. Urquiza, J.; Cuesta-Geijo, M.Á.; García-Dorival, I.; Fernández, Ó.; Del Puerto, A.; Díaz, J.F.; Alonso, C. Identification of a Potential Entry-Fusion Complex Based on Sequence Homology of African Swine Fever and Vaccinia Virus. *Viruses* **2024**, *16*, 349, doi:10.3390/v16030349.
42. Hernáez, B.; Guerra, M.; Salas, M.L.; Andrés, G. African Swine Fever Virus Undergoes Outer Envelope Disruption, Capsid Disassembly and Inner Envelope Fusion before Core Release from Multivesicular Endosomes. *PLoS Pathog* **2016**, *12*, e1005595, doi:10.1371/journal.ppat.1005595.
43. Dixon, L.K.; Chapman, D.A.G.; Netherton, C.L.; Upton, C. African Swine Fever Virus Replication and Genomics. *Virus Res* **2013**, *173*, 3–14, doi:10.1016/j.virusres.2012.10.020.
44. Breese, S.S.; DeBoer, C.J. Electron Microscope Observations of African Swine Fever Virus in Tissue Culture Cells. *Virology* **1966**, *28*, 420–428, doi:10.1016/0042-6822(66)90054-7.
45. Galindo, I.; Alonso, C. African Swine Fever Virus: A Review. *Viruses* **2017**, *9*, 103, doi:10.3390/v9050103.
46. Manso Ribeiro, J.; Rosa Azevedo, J.A. Reapparition de La Peste Porcine Africaine Au Portugal. B. *Bull. Off. Int. Epizoot.* **1961**, *55*, 88–106.
47. Cwynar, P.; Stojkov, J.; Wlazlak, K. African Swine Fever Status in Europe. *Viruses* **2019**, *11*, 310, doi:10.3390/v11040310.
48. Comisión Europea. European Commission Recognises Sardinia and Sweden as Free of ASF. Noticias diarias 24/09/2024. Disponible en: https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/mex_24_4841, accedido: 20/10/2024.
49. Rowlands, R.J.; Michaud, V.; Heath, L.; Hutchings, G.; Oura, C.; Vosloo, W.; Dwarka, R.; Onashvili, T.; Albina, E.; Dixon, L.K. African Swine Fever Virus Isolate, Georgia, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* **2008**, *14*, 1870–1874, doi:10.3201/eid1412.080591.
50. Organización Mundial de Sanidad Animal. Gestión de Eventos. Disponible en: https://wahis.woah.org/#/event-management, accedido: 01/08/2024.
51. Sun, E.; Huang, L.; Zhang, X.; Zhang, J.; Shen, D.; Zhang, Z.; Wang, Z.; Huo, H.; Wang, W.; Huangfu, H.; et al. Genotype I African Swine Fever Viruses Emerged in Domestic Pigs in China and Caused Chronic Infection. *Emerging Microbes & Infections* **2021**, *10*, 2183–2193, doi:10.1080/22221751.2021.1999779.
52. Gaudreault, N.N.; Madden, D.W.; Wilson, W.C.; Trujillo, J.D.; Richt, J.A. African Swine Fever Virus: An Emerging DNA Arbovirus. *Front. Vet. Sci.* **2020**, *7*, 215, doi:10.3389/fvets.2020.00215.
53. Boinas, F.S.; Wilson, A.J.; Hutchings, G.H.; Martins, C.; Dixon, L.J. The Persistence of African Swine Fever Virus in Field-Infected Ornithodoros Erraticus during the ASF Endemic Period in Portugal. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e20383, doi:10.1371/journal.pone.0020383.
54. Sánchez-Vizcaíno, J.M.; Mur, L.; Gomez-Villamandos, J.C.; Carrasco, L. An Update on the Epidemiology and Pathology of African Swine Fever. *Journal of Comparative Pathology* **2015**, *152*, 9–21, doi:10.1016/j.jcpa.2014.09.003.
55. European Food Safety Authority (EFSA); Ståhl, K.; Boklund, A.E.; Podgórski, T.; Vergne, T.; Abrahantes, J.C.; Cattaneo, E.; Papanikolaou, A.; Mur, L. Epidemiological

Analysis of African Swine Fever in the European Union during 2023. **2024**, doi:10.2903/j.efsa.2024.8809.

56. Sánchez-Cordón, P.J.; Vidaña, B.; Neimanis, A.; Núñez, A.; Wikstrom, E.; Gavier-Widén, D. Pathology of African Swine Fever. En *Understanding and combatting African Swine Fever: A European perspective*; Editorial Brill | Wageningen Academic, **2021**; pp. 87–132 ISBN 978-90-8686-910-7.
57. Sanchez-Vizcaino, JM.; Arias, M. African swine fever virus. En *Diseases of Swine*; Editorial Wiley-Blackwell, **2012**; pp. 396–404. ISBN: 978-0-8138-2267-9.
58. Salguero, F.J. Comparative Pathology and Pathogenesis of African Swine Fever Infection in Swine. *Front. Vet. Sci.* **2020**, *7*, 282, doi:10.3389/fvets.2020.00282.
59. Sánchez-Cordón, P.J.; Chapman, D.; Jabbar, T.; Reis, A.L.; Goatley, L.; Netherton, C.L.; Taylor, G.; Montoya, M.; Dixon, L. Different Routes and Doses Influence Protection in Pigs Immunised with the Naturally Attenuated African Swine Fever Virus Isolate OURT88/3. *Antiviral Research* **2017**, *138*, 1–8, doi:10.1016/j.antiviral.2016.11.021.
60. Vlasov, M.; Sindryakova, I.; Kudryashov, D.; Morgunov, S.; Kolbasova, O.; Lyska, V.; Zhivoderov, S.; Pivova, E.; Balyshev, V.; Namsrayn, S.; et al. Administration Routes and Doses of the Attenuated African Swine Fever Virus Strain PSA-1NH Influence Cross-Protection of Pigs against Heterologous Challenge. *Animals* **2024**, *14*, 1277, doi:10.3390/ani14091277.
61. Ståhl, K.; Sternberg-Lewerin, S.; Blome, S.; Viltrop, A.; Penrith, M.-L.; Chenais, E. Lack of Evidence for Long Term Carriers of African Swine Fever Virus - a Systematic Review. *Virus Research* **2019**, *272*, 197725, doi:10.1016/j.virusres.2019.197725.
62. Lai, D.C.; Oh, T.; Nguyen, H.T.; Do, D.T. The Study of Antigen Carrying and Lesions Observed in Pigs That Survived Post African Swine Fever Virus Infection. *Trop Anim Health Prod* **2022**, *54*, 264, doi:10.1007/s11250-022-03229-0.
63. Oura, C.A.L.; Edwards, L.; Batten, C.A. Virological Diagnosis of African Swine Fever—Comparative Study of Available Tests. *Virus Research* **2013**, *173*, 150–158, doi:10.1016/j.virusres.2012.10.022.
64. Sun, E.; Zhang, Z.; Wang, Z.; He, X.; Zhang, X.; Wang, L.; Wang, W.; Huang, L.; Xi, F.; Huangfu, H.; et al. Emergence and Prevalence of Naturally Occurring Lower Virulent African Swine Fever Viruses in Domestic Pigs in China in 2020. *Sci. China Life Sci.* **2021**, *64*, 752–765, doi:10.1007/s11427-021-1904-4.
65. Gallardo, C.; Soler, A.; Nurmoja, I.; Cano-Gómez, C.; Cvetkova, S.; Frant, M.; Woźniakowski, G.; Simón, A.; Pérez, C.; Nieto, R.; et al. Dynamics of African Swine Fever Virus (ASFV) Infection in Domestic Pigs Infected with Virulent, Moderate Virulent and Attenuated Genotype II ASFV European Isolates. *Transbound. Emerg. Dis.* **2021**, *68*, 2826–2841, doi:10.1111/tbed.14222.
66. European Union Laboratory for African Swine Fever. Guidelines. Disponible en: https://asf-referencelab.info/asf-diagnosis/guidelines/, accedido: 01/07/2024.
67. European Union Laboratory for African Swine Fever Processing of Samples for African Swine Fever (ASF) Diagnosis (SOP/CISA/ASF/SAMPLES/1/). **2018**. Acceso en línea: https://asf-referencelab.info/asf/images/ficherosasf/PROTOCOLOS-EN/SOP-ASF-SAMPLES-1_REV5_2021.pdf
68. Randriamparany, T.; Kouakou, K.V.; Michaud, V.; Fernández-Pinero, J.; Gallardo, C.; Le Potier, M.-F.; Rabenarivahiny, R.; Couacy-Hymann, E.; Raherimandimby, M.; Albina, E. African Swine Fever Diagnosis Adapted to Tropical Conditions by the Use

of Dried-Blood Filter Papers. *Transbound Emerg Dis* **2016**, *63*, 379–388, doi:10.1111/tbed.12295.

69. King, D.P.; Reid, S.M.; Hutchings, G.H.; Grierson, S.S.; Wilkinson, P.J.; Dixon, L.K.; Bastos, A.D.S.; Drew, T.W. Development of a TaqMan® PCR Assay with Internal Amplification Control for the Detection of African Swine Fever Virus. *Journal of Virological Methods* **2003**, *107*, 53–61, doi:10.1016/S0166-0934(02)00189-1.
70. Fernández-Pinero, J.; Gallardo, C.; Elizalde, M.; Robles, A.; Gómez, C.; Bishop, R.; Heath, L.; Couacy-Hymann, E.; Fasina, F.O.; Pelayo, V.; et al. Molecular Diagnosis of African Swine Fever by a New Real-Time PCR Using Universal Probe Library: UPL PCR for African Swine Fever Virus. *Transbound Emerg Dis* **2013**, *60*, 48–58, doi:10.1111/j.1865-1682.2012.01317.x.
71. Agüero, M.; Fernández, J.; Romero, L.; Sánchez Mascaraque, C.; Arias, M.; Sánchez-Vizcaíno, J.M. Highly Sensitive PCR Assay for Routine Diagnosis of African Swine Fever Virus in Clinical Samples. *J Clin Microbiol* **2003**, *41*, 4431–4434, doi:10.1128/JCM.41.9.4431-4434.2003.
72. World Organisation for Animal Health. Addressing African swine fever: Protocols and Guidelines for Laboratory Diagnosis. **2024**. doi: https://doi.org/10.20506/asf.3475. Licencia: CC BY-SA 3.0 IGO.
73. Pikalo, J.; Carrau, T.; Deutschmann, P.; Fischer, M.; Schlottau, K.; Beer, M.; Blome, S. Performance Characteristics of Real-Time PCRs for African Swine Fever Virus Genome Detection—Comparison of Twelve Kits to an OIE-Recommended Method. *Viruses* **2022**, *14*, 220, doi:10.3390/v14020220.
74. Yang, H.; Peng, Z.; Song, W.; Zhang, C.; Fan, J.; Chen, H.; Hua, L.; Pei, J.; Tang, X.; Chen, H.; et al. A Triplex Real-Time PCR Method to Detect African Swine Fever Virus Gene-Deleted and Wild Type Strains. *Front. Vet. Sci.* **2022**, *9*, 943099, doi:10.3389/fvets.2022.943099.
75. Velazquez-Salinas, L.; Ramirez-Medina, E.; Rai, A.; Pruitt, S.; Vuono, E.A.; Espinoza, N.; Gladue, D.P.; Borca, M.V. Development Real-Time PCR Assays to Genetically Differentiate Vaccinated Pigs From Infected Pigs With the Eurasian Strain of African Swine Fever Virus. *Front. Vet. Sci.* **2021**, *8*, 768869, doi:10.3389/fvets.2021.768869.
76. Bool, P.H., Ordas, A., Sanchez Botija, C., 1969. El diagnóstico de la peste porcina africana por inmunofluorescencia (The diagnosis of African swine fever by immunofluorescence). Bulletin of the OIE 72, 819–839.
77. European Union Laboratory for African Swine Fever. Procedure for Growing and Preparation of Established Cell Lines for ASFV Propagation (VERO, MS) (SOP/CISA/ASF/CELLS/1). **2018**. Acceso en línea: https://asf-referencelab.info/asf/images/ficherosasf/PROTOCOLOS-EN/SOP-ASF-VIRUS_TITRATION-1_REV2018.pdf.
78. Gallardo, C.; Nieto, R.; Soler, A.; Pelayo, V.; Fernández-Pinero, J.; Markowska-Daniel, I.; Pridotkas, G.; Nurmoja, I.; Granta, R.; Simón, A.; et al. Assessment of African Swine Fever Diagnostic Techniques as a Response to the Epidemic Outbreaks in Eastern European Union Countries: How To Improve Surveillance and Control Programs. *J. Clin. Microbiol.* **2015**, *53*, 2555–2565, doi:10.1128/JCM.00857-15.
79. European Union Laboratory for African Swine Fever. Production of immunoblotting strips for african swine fever antibody detection (SOP/CISA/ASF/IB-STRIP/1/). **2018**.

Acceso en línea: https://asf-referencelab.info/asf/images/ficherosasf/PROTOCOLOS-EN/SOP-ASF-IB-STRIPS.pdf.

80. European Union Laboratory for African Swine Fever. Preparation of african swine fever virus-coated 96-well plates for indirect immunoperoxidase test (IPT) (SOP/CISA/IPT-PLATES/1). 2018. Acceso en línea: https://asf-referencelab.info/asf/images/ficherosasf/PROTOCOLOS-EN/SOP-IPT-PLATES-1_rev2018.pdf.
81. World Organisation for Animal Health. Visión General de La Red de Laboratorios de Referencia de La OIE Para La Peste Porcina Africana (PPA) de Las Pruebas de Diagnóstico de La PPA Para Una Aplicación En El Terreno. **2022**. Acceso en línea: https://www.woah.org/app/uploads/2022/03/es-oie-asf-poc-tests-guide-final.pdf.
82. Reglamento (UE) 2016/429 Del Parlamento Europeo y del Consejo, de 9 de Marzo de 2016, relativo a las enfermedades transmisibles de los Animales y por el que se modifican o derogan algunos actos en materia de sanidad animal. Diario Oficial de la Unión Europea 2016.
83. Martínez, M.; De La Torre, A.; Sánchez-Vizcaíno, J.M.; Bellini, S. Biosecurity Measures against African Swine Fever in Domestic Pigs. En *Understanding and combatting African Swine Fever: A European perspective*; Editorial Brill | Wageningen Academic, **2021**; pp. 263–280 ISBN 978-90-8686-910-7.
84. Dirección General de Sanidad de la Produción Agraria; Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad. Manual Práctico de Operaciones En La Lucha Contra La Peste Porcina Africana (PPA). **2023**. Acceso en línea: https://www.mapa.gob.es/en/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/manualpracticoppa_tcm38-428107.pdf.
85. Viltrop, A.; Boinas, F.; Depner, K.; Jori, F.; Kolbasov, D.; Laddomada, A.; Stahl, K.; Chenais, E. African Swine Fever Epidemiology, Surveillance and Control. En *Understanding and combatting African Swine Fever: A European perspective*; Editorial Brill | Wageningen Academic, **2021**; pp. 229–254 ISBN 978-90-8686-910-7.
86. Dirección General de Sanidad de la Produción Agraria; Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad. Situación de La Peste Porcina Africana 2024. Accedido en línea: https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/informeppa_2024-06-14_tcm30-437584.pdf
87. Bosch-Camós, L.; López, E.; Rodriguez, F. African Swine Fever Vaccines: A Promising Work Still in Progress. *Porc Health Manag* **2020**, *6*, 17, doi:10.1186/s40813-020-00154-2.
88. Hess, A. What Does Vietnam's ASF Vaccine Approval Mean for the Global Battle? National Hog Farmer 2023. Disponible en: https://www.nationalhogfarmer.com/livestock-management/what-does-vietnam-s-asf-vaccine-approval-mean-for-the-global-battle-, accedido: 10/09/2024.
89. Ter Beek, V. ASF Vietnam: Vaccination Trials Suspended Due to Pig Deaths. Pig Progress 2022. Disponible en: https://www.pigprogress.net/health-nutrition/health/asf-vietnam-vaccination-trials-suspensed-due-to-pig-deaths/#:~:text=Vietnam%20has%20temporarily%20suspended%20the,month%2C%20news%20agency%20Reuters%20reported, accedido: 10/09/2024.
90. Linden, J. Philippines, Vietnam Pin Hopes on Vaccination for Future ASF Control. Feed Strategy 2024. Disponible en: https://www.feedstrategy.com/animal-health-

veterinary/african-swine-fever/article/15679982/philippines-vietnam-pin-hopes-on-vaccination-for-future-asf-control, accedido: 06/09/2024.

91. Rock, D.L. Challenges for African Swine Fever Vaccine Development—"… Perhaps the End of the Beginning." *Veterinary Microbiology* **2017**, *206*, 52–58, doi:10.1016/j.vetmic.2016.10.003.
92. Pikalo, J.; Porfiri, L.; Akimkin, V.; Roszyk, H.; Pannhorst, K.; Kangethe, R.T.; Wijewardana, V.; Sehl-Ewert, J.; Beer, M.; Cattoli, G.; et al. Vaccination With a Gamma Irradiation-Inactivated African Swine Fever Virus Is Safe But Does Not Protect Against a Challenge. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 832264, doi:10.3389/fimmu.2022.832264.
93. Kihm, U.; Ackermann, M.; Mueller, H.; Pool, R. Approaches to Vaccination. En *African Swine Fever*; Developments in Veterinary Virology; Springer US, **1987**; Vol. 3, pp. 127–144 ISBN 978-1-4612-9437-5.
94. Blome, S.; Gabriel, C.; Beer, M. Modern Adjuvants Do Not Enhance the Efficacy of an Inactivated African Swine Fever Virus Vaccine Preparation. *Vaccine* **2014**, *32*, 3879–3882, doi:10.1016/j.vaccine.2014.05.051.
95. Cadenas-Fernández, E.; Sánchez-Vizcaíno, J.M.; Van Den Born, E.; Kosowska, A.; Van Kilsdonk, E.; Fernández-Pacheco, P.; Gallardo, C.; Arias, M.; Barasona, J.A. High Doses of Inactivated African Swine Fever Virus Are Safe, but Do Not Confer Protection against a Virulent Challenge. *Vaccines* **2021**, *9*, 242, doi:10.3390/vaccines9030242.
96. Zhang, H.; Zhao, S.; Zhang, H.; Qin, Z.; Shan, H.; Cai, X. Vaccines for African Swine Fever: An Update. *Front. Microbiol.* **2023**, *14*, 1139494, doi:10.3389/fmicb.2023.1139494.
97. Pérez-Núñez, D.; Sunwoo, S.-Y.; Sánchez, E.G.; Haley, N.; García-Belmonte, R.; Nogal, M.; Morozov, I.; Madden, D.; Gaudreault, N.N.; Mur, L.; et al. Evaluation of a Viral DNA-Protein Immunization Strategy against African Swine Fever in Domestic Pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **2019**, *208*, 34–43, doi:10.1016/j.vetimm.2018.11.018.
98. Sunwoo, S.-Y.; Pérez-Núñez, D.; Morozov, I.; Sánchez, E.G.; Gaudreault, N.N.; Trujillo, J.D.; Mur, L.; Nogal, M.; Madden, D.; Urbaniak, K.; et al. DNA-Protein Vaccination Strategy Does Not Protect from Challenge with African Swine Fever Virus Armenia 2007 Strain. *Vaccines* **2019**, *7*, 12, doi:10.3390/vaccines7010012.
99. Lopera-Madrid, J.; Osorio, J.E.; He, Y.; Xiang, Z.; Adams, L.G.; Laughlin, R.C.; Mwangi, W.; Subramanya, S.; Neilan, J.; Brake, D.; et al. Safety and Immunogenicity of Mammalian Cell Derived and Modified Vaccinia Ankara Vectored African Swine Fever Subunit Antigens in Swine. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **2017**, *185*, 20–33, doi:10.1016/j.vetimm.2017.01.004.
100. Cadenas-Fernández, E.; Sánchez-Vizcaíno, J.M.; Kosowska, A.; Rivera, B.; Mayoral-Alegre, F.; Rodríguez-Bertos, A.; Yao, J.; Bray, J.; Lokhandwala, S.; Mwangi, W.; et al. Adenovirus-Vectored African Swine Fever Virus Antigens Cocktail Is Not Protective against Virulent Arm07 Isolate in Eurasian Wild Boar. *Pathogens* **2020**, *9*, 171, doi:10.3390/pathogens9030171.
101. Lokhandwala, S.; Petrovan, V.; Popescu, L.; Sangewar, N.; Elijah, C.; Stoian, A.; Olcha, M.; Ennen, L.; Bray, J.; Bishop, R.P.; et al. Adenovirus-Vectored African Swine Fever Virus Antigen Cocktails Are Immunogenic but Not Protective against Intranasal Challenge with Georgia 2007/1 Isolate. *Veterinary Microbiology* **2019**, *235*, 10–20, doi:10.1016/j.vetmic.2019.06.006.

102. Goatley, L.C.; Reis, A.L.; Portugal, R.; Goldswain, H.; Shimmon, G.L.; Hargreaves, Z.; Ho, C.-S.; Montoya, M.; Sánchez-Cordón, P.J.; Taylor, G.; et al. A Pool of Eight Virally Vectored African Swine Fever Antigens Protect Pigs against Fatal Disease. *Vaccines* **2020**, *8*, 234, doi:10.3390/vaccines8020234.
103. Muñoz-Pérez, C.; Jurado, C.; Sánchez-Vizcaíno, J.M. African Swine Fever Vaccine: Turning a Dream into Reality. *Transbound. Emerg. Dis.* **2021**, *68*, 2657–2668, doi:10.1111/tbed.14191.
104. Bourry, O.; Hutet, E.; Le Dimna, M.; Lucas, P.; Blanchard, Y.; Chastagner, A.; Paboeuf, F.; Le Potier, M.-F. Oronasal or Intramuscular Immunization with a Thermo-Attenuated ASFV Strain Provides Full Clinical Protection against Georgia 2007/1 Challenge. *Viruses* **2022**, *14*, 2777, doi:10.3390/v14122777.
105. Leitão, A.; Cartaxeiro, C.; Coelho, R.; Cruz, B.; Parkhouse, R.M.E.; Portugal, F.C.; Vigário, J.D.; Martins, C.L.V. The Non-Haemadsorbing African Swine Fever Virus Isolate ASFV/NH/P68 Provides a Model for Defining the Protective Anti-Virus Immune Response. *Journal of General Virology* **2001**, *82*, 513–523, doi:10.1099/0022-1317-82-3-513.
106. Gallardo, C.; Soler, A.; Rodze, I.; Nieto, R.; Cano-Gómez, C.; Fernandez-Pinero, J.; Arias, M. Attenuated and Non-haemadsorbing Genotype II African Swine Fever Virus Isolated in Europe, Latvia 2017. *Transbound Emerg Dis* **2019**, *66*, 1399–1404, doi:10.1111/tbed.13132.
107. Lacasta, A.; Monteagudo, P.L.; Jiménez-Marín, Á.; Accensi, F.; Ballester, M.; Argilaguet, J.; Galindo-Cardiel, I.; Segalés, J.; Salas, M.L.; Domínguez, J.; et al. Live Attenuated African Swine Fever Viruses as Ideal Tools to Dissect the Mechanisms Involved in Viral Pathogenesis and Immune Protection. *Vet Res* **2015**, *46*, 135, doi:10.1186/s13567-015-0275-z.
108. Krug, P.W.; Holinka, L.G.; O'Donnell, V.; Reese, B.; Sanford, B.; Fernandez-Sainz, I.; Gladue, D.P.; Arzt, J.; Rodriguez, L.; Risatti, G.R.; et al. The Progressive Adaptation of a Georgian Isolate of African Swine Fever Virus to Vero Cells Leads to a Gradual Attenuation of Virulence in Swine Corresponding to Major Modifications of the Viral Genome. *J Virol* **2015**, *89*, 2324–2332, doi:10.1128/JVI.03250-14.
109. Gladue, D.P.; Borca, M.V. Recombinant ASF Live Attenuated Virus Strains as Experimental Vaccine Candidates. *Viruses* **2022**, *14*, 878, doi:10.3390/v14050878.
110. Turlewicz-Podbielska, H.; Kuriga, A.; Niemyjski, R.; Tarasiuk, G.; Pomorska-Mól, M. African Swine Fever Virus as a Difficult Opponent in the Fight for a Vaccine—Current Data. *Viruses* **2021**, *13*, 1212, doi:10.3390/v13071212.
111. O'Donnell, V.; Holinka, L.G.; Gladue, D.P.; Sanford, B.; Krug, P.W.; Lu, X.; Arzt, J.; Reese, B.; Carrillo, C.; Risatti, G.R.; et al. African Swine Fever Virus Georgia Isolate Harboring Deletions of MGF360 and MGF505 Genes Is Attenuated in Swine and Confers Protection against Challenge with Virulent Parental Virus. *J Virol* **2015**, *89*, 6048–6056, doi:10.1128/JVI.00554-15.
112. Borca, M.V.; Ramirez-Medina, E.; Silva, E.; Vuono, E.; Rai, A.; Pruitt, S.; Espinoza, N.; Velazquez-Salinas, L.; Gay, C.G.; Gladue, D.P. ASFV-G-ΔI177L as an Effective Oral Nasal Vaccine against the Eurasia Strain of Africa Swine Fever. *Viruses* **2021**, *13*, 765, doi:10.3390/v13050765.
113. Borca, M.V.; Carrillo, C.; Zsak, L.; Laegreid, W.W.; Kutish, G.F.; Neilan, J.G.; Burrage, T.G.; Rock, D.L. Deletion of a CD2-Like Gene, 8-DR, from African Swine Fever Virus

Affects Viral Infection in Domestic Swine. *J Virol* **1998**, *72*, 2881–2889, doi:10.1128/JVI.72.4.2881-2889.1998.

114. Borca, M.V.; O'Donnell, V.; Holinka, L.G.; Risatti, G.R.; Ramirez-Medina, E.; Vuono, E.A.; Shi, J.; Pruitt, S.; Rai, A.; Silva, E.; et al. Deletion of CD2-like Gene from the Genome of African Swine Fever Virus Strain Georgia Does Not Attenuate Virulence in Swine. *Scientific Reports* **2020**, *10*, 494, doi:10.1038/s41598-020-57455-3.
115. Pasick, J. Application of DIVA Vaccines and Their Companion Diagnostic Tests to Foreign Animal Disease Eradication. *Anim. Health. Res. Rev.* **2004**, *5*, 257–262, doi:10.1079/AHR200479.
116. Sánchez, E.G.; Pérez-Núñez, D.; Revilla, Y. Development of Vaccines against African Swine Fever Virus. *Virus Research* **2019**, *265*, 150–155, doi:10.1016/j.virusres.2019.03.022.
117. Ramirez-Medina, E.; Vuono, E.; Rai, A.; Pruitt, S.; Espinoza, N.; Velazquez-Salinas, L.; Pina-Pedrero, S.; Zhu, J.; Rodriguez, F.; Borca, M.V.; et al. Deletion of E184L, a Putative DIVA Target from the Pandemic Strain of African Swine Fever Virus, Produces a Reduction in Virulence and Protection against Virulent Challenge. *J Virol* **2022**, *96*, e01419-21, doi:10.1128/JVI.01419-21.
118. Ramirez-Medina, E.; Vuono, E.; Silva, E.; Rai, A.; Valladares, A.; Pruitt, S.; Espinoza, N.; Velazquez-Salinas, L.; Borca, M.V.; Gladue, D.P. Evaluation of the Deletion of MGF110-5L-6L on Swine Virulence from the Pandemic Strain of African Swine Fever Virus and Use as a DIVA Marker in Vaccine Candidate ASFV-G-ΔI177L. *J Virol* **2022**, *96*, e00597-22, doi:10.1128/jvi.00597-22.
119. Borca, M.V.; Ramirez-Medina, E.; Espinoza, N.; Rai, A.; Spinard, E.; Velazquez-Salinas, L.; Valladares, A.; Silva, E.; Burton, L.; Meyers, A.; et al. Deletion of the EP402R Gene from the Genome of African Swine Fever Vaccine Strain ASFV-G-ΔI177L Provides the Potential Capability of Differentiating between Infected and Vaccinated Animals. *Viruses* **2024**, *16*, 376, doi:10.3390/v16030376.
120. Wang, L.; Fu, D.; Tesfagaber, W.; Li, F.; Chen, W.; Zhu, Y.; Sun, E.; Wang, W.; He, X.; Guo, Y.; et al. Development of an ELISA Method to Differentiate Animals Infected with Wild-Type African Swine Fever Viruses and Attenuated HLJ/18-7GD Vaccine Candidate. *Viruses* **2022**, *14*, 1731, doi:10.3390/v14081731.
121. Barasona, J.A.; Gallardo, C.; Cadenas-Fernández, E.; Jurado, C.; Rivera, B.; Rodríguez-Bertos, A.; Arias, M.; Sánchez-Vizcaíno, J.M. First Oral Vaccination of Eurasian Wild Boar Against African Swine Fever Virus Genotype II. *Front. Vet. Sci.* **2019**, *6*, 137, doi:10.3389/fvets.2019.00137.
122. Lewis, T.; Zsak, L.; Burrage, T.G.; Lu, Z.; Kutish, G.F.; Neilan, J.G.; Rock, D.L. An African Swine Fever Virus ERV1-ALR Homologue, 9GL, Affects Virion Maturation and Viral Growth in Macrophages and Viral Virulence in Swine. *J Virol* **2000**, *74*, 1275–1285, doi:10.1128/JVI.74.3.1275-1285.2000.
123. Rodríguez, I.; Redrejo-Rodríguez, M.; Rodríguez, J.M.; Alejo, A.; Salas, J.; Salas, M.L. African Swine Fever Virus pB119L Protein Is a Flavin Adenine Dinucleotide-Linked Sulfhydryl Oxidase. *J Virol* **2006**, *80*, 3157–3166, doi:10.1128/JVI.80.7.3157-3166.2006.
124. O'Donnell, V.; Holinka, L.G.; Krug, P.W.; Gladue, D.P.; Carlson, J.; Sanford, B.; Alfano, M.; Kramer, E.; Lu, Z.; Arzt, J.; et al. African Swine Fever Virus Georgia 2007 with a Deletion of Virulence-Associated Gene 9GL (B119L), When Administered at Low Doses, Leads to Virus Attenuation in Swine and Induces an Effective Protection

against Homologous Challenge. *Journal of Virology* **2015**, *89*, 8556–8566, doi:10.1128/JVI.00969-15.

125. Malogolovkin, A.; Burmakina, G.; Tulman, E.R.; Delhon, G.; Diel, D.G.; Salnikov, N.; Kutish, G.F.; Kolbasov, D.; Rock, D.L. African Swine Fever Virus CD2v and C-Type Lectin Gene Loci Mediate Serological Specificity. *Journal of General Virology* **2015**, *96*, 866–873, doi:10.1099/jgv.0.000024.
126. Hurtado, C.; Granja, A.G.; Bustos, M.J.; Nogal, M.L.; González De Buitrago, G.; De Yébenes, V.G.; Salas, M.L.; Revilla, Y.; Carrascosa, A.L. The C-Type Lectin Homologue Gene (EP153R) of African Swine Fever Virus Inhibits Apoptosis Both in Virus Infection and in Heterologous Expression. *Virology* **2004**, *326*, 160–170, doi:10.1016/j.virol.2004.05.019.
127. Spinard, E.; Azzinaro, P.; Rai, A.; Espinoza, N.; Ramirez-Medina, E.; Valladares, A.; Borca, M.V.; Gladue, D.P. Complete Structural Predictions of the Proteome of African Swine Fever Virus Strain Georgia 2007. *Microbiol Resour Announc* **2022**, *11*, e00881-22, doi:10.1128/mra.00881-22.
128. Burmakina, G.; Malogolovkin, A.; Tulman, E.R.; Zsak, L.; Delhon, G.; Diel, D.G.; Shobogorov, N.M.; Morgunov, Yu.P.; Morgunov, S.Yu.; Kutish, G.F.; et al. African Swine Fever Virus Serotype-Specific Proteins Are Significant Protective Antigens for African Swine Fever. *Journal of General Virology* **2016**, *97*, 1670–1675, doi:10.1099/jgv.0.000490.
129. Gallardo, C.; Sánchez, E.G.; Pérez-Núñez, D.; Nogal, M.; De León, P.; Carrascosa, Á.L.; Nieto, R.; Soler, A.; Arias, M.L.; Revilla, Y. African Swine Fever Virus (ASFV) Protection Mediated by NH/P68 and NH/P68 Recombinant Live-Attenuated Viruses. *Vaccine* **2018**, *36*, 2694–2704, doi:10.1016/j.vaccine.2018.03.040.
130. Gladue, D.P.; O'Donnell, V.; Ramirez-Medina, E.; Rai, A.; Pruitt, S.; Vuono, E.A.; Silva, E.; Velazquez-Salinas, L.; Borca, M.V. Deletion of CD2-Like (CD2v) and C-Type Lectin-Like (EP153R) Genes from African Swine Fever Virus Georgia-Δ9GL Abrogates Its Effectiveness as an Experimental Vaccine. *Viruses* **2020**, *12*, 1185, doi:10.3390/v12101185.
131. Lopez, E.; Bosch-Camós, L.; Ramirez-Medina, E.; Vuono, E.; Navas, M.J.; Muñoz, M.; Accensi, F.; Zhang, J.; Alonso, U.; Argilaguet, J.; et al. Deletion Mutants of the Attenuated Recombinant ASF Virus, BA71ΔCD2, Show Decreased Vaccine Efficacy. *Viruses* **2021**, *13*, 1678, doi:10.3390/v13091678.
132. Pérez-Núñez, D.; García-Urdiales, E.; Martínez-Bonet, M.; Nogal, M.L.; Barroso, S.; Revilla, Y.; Madrid, R. CD2v Interacts with Adaptor Protein AP-1 during African Swine Fever Infection. *PLOS ONE* **2015**, *10*, e0123714, doi:10.1371/journal.pone.0123714.
133. Zhang, M.; Lv, L.; Luo, H.; Cai, H.; Yu, L.; Jiang, Y.; Gao, F.; Tong, W.; Li, L.; Li, G.; et al. The CD2v Protein of African Swine Fever Virus Inhibits Macrophage Migration and Inflammatory Cytokines Expression by Downregulating EGR1 Expression through Dampening ERK1/2 Activity. *Vet Res* **2023**, *54*, 106, doi:10.1186/s13567-023-01239-w.
134. Monteagudo, P.L.; Lacasta, A.; López, E.; Bosch, L.; Collado, J.; Pina-Pedrero, S.; Correa-Fiz, F.; Accensi, F.; Navas, M.J.; Vidal, E.; et al. BA71ΔCD2: A New Recombinant Live Attenuated African Swine Fever Virus with Cross-Protective Capabilities. *J Virol* **2017**, *91*, e01058-17, doi:10.1128/JVI.01058-17.

135. Marín-Moraleda, D.; Muñoz-Basagoiti, J.; Tort-Miró, A.; Navas, M.J.; Muñoz, M.; Vidal, E.; Cobos, À.; Martín-Mur, B.; Meas, S.; Motuzova, V.; et al. Elucidating the Onset of Cross-Protective Immunity after Intranasal Vaccination with the Attenuated African Swine Fever Vaccine Candidate BA71ΔCD2. *Vaccines* **2024**, *12*, 517, doi:10.3390/vaccines12050517.
136. Pei, Y.; Hodgins, D.C.; Wu, J.; Welch, S.-K.W.; Calvert, J.G.; Li, G.; Du, Y.; Song, C.; Yoo, D. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus as a Vector: Immunogenicity of Green Fluorescent Protein and Porcine Circovirus Type 2 Capsid Expressed from Dedicated Subgenomic RNAs. *Virology* **2009**, *389*, 91–99, doi:10.1016/j.virol.2009.03.036.
137. Kumari, S.; Chaudhari, J.; Huang, Q.; Gauger, P.; De Almeida, M.N.; Liang, Y.; Ly, H.; Vu, H.L.X. Immunogenicity and Protective Efficacy of a Recombinant Pichinde Viral-Vectored Vaccine Expressing Influenza Virus Hemagglutinin Antigen in Pigs. *Vaccines* **2022**, *10*, 1400, doi:10.3390/vaccines10091400.
138. Borca, M.V.; O'Donnell, V.; Holinka, L.G.; Sanford, B.; Azzinaro, P.A.; Risatti, G.R.; Gladue, D.P. Development of a Fluorescent ASFV Strain That Retains the Ability to Cause Disease in Swine. *Sci Rep* **2017**, *7*, 46747, doi:10.1038/srep46747.
139. Huang, L.; Liu, H.; Ye, G.; Liu, X.; Chen, W.; Wang, Z.; Zhao, D.; Zhang, Z.; Feng, C.; Hu, L.; et al. Deletion of African Swine Fever Virus (ASFV) H240R Gene Attenuates the Virulence of ASFV by Enhancing NLRP3-Mediated Inflammatory Responses. *J Virol* **2023**, *97*, e01227-22, doi:10.1128/jvi.01227-22.
140. Li, S.; Chen, L.; Peng, X.; Wang, C.; Qin, B.; Tan, D.; Han, C.; Yang, H.; Ren, X.; Liu, F.; et al. Overview of the Reporter Genes and Reporter Mouse Models. *Anim Models and Exp Med* **2018**, *1*, 29–35, doi:10.1002/ame2.12008.
141. Yang, Y.; Zhang, W.; Huan, H.; Xia, W.; Chen, Y.; Wang, P.; Liu, Y. Construction of an Integrated mCherry Red Fluorescent Protein Expression System for Labeling and Tracing in Lactiplantibacillus Plantarum WCFS1. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 690270, doi:10.3389/fmicb.2021.690270.
142. Kafka, A.; Ermogenous, C.; Ombrato, L. Isolation of Live Immune Cells from the Tumor Microenvironment by FACS. En *Cancer Immunotherapy*; Methods in Molecular Biology; Springer US, **2024**; Vol. 2748, pp. 1–12 ISBN 978-1-07-163592-6.
143. Crowther, J.R. *The ELISA Guidebook*; Methods in Molecular Biology™; 2nd ed.; Humana Press: Totowa, NJ, 2009; ISBN 978-1-60327-253-7.
144. Ling, M.M.; Ricks, C.; Lea, P. Multiplexing Molecular Diagnostics and Immunoassays Using Emerging Microarray Technologies. *Expert Review of Molecular Diagnostics* **2007**, *7*, 87–98, doi:10.1586/14737159.7.1.87.
145. Koczula, K.M.; Gallotta, A. Lateral Flow Assays. *Essays in Biochemistry* **2016**, *60*, 111–120, doi:10.1042/EBC20150012.
146. Calucho, E.; Parolo, C.; Rivas, L.; Álvarez-Diduk, R.; Merkoçi, A. Nanoparticle-Based Lateral Flow Assays. En *Comprehensive Analytical Chemistry*; Elsevier, **2020**; Vol. 89, pp. 313–359 ISBN 978-0-444-64345-2.
147. Van den Born, E.; Arias Neira, M.L.; Gallardo Frontaura, C.; Fernández Piñero, J.; Zádori, Z.; Mészáros, I.; Olasz, F.; Sánchez-Vizcaíno, J.M.; Barroso Arévalo, S.; Barasona García-Arévalo, J.Á.; et al. Attenuated African Swine Fever Virus and Use Thereof in Vaccine Compositions. Patent Not yet published.

148. Tamás, V.; Righi, C.; Mészáros, I.; D'Errico, F.; Olasz, F.; Casciari, C.; Zádori, Z.; Magyar, T.; Petrini, S.; Feliziani, F. Involvement of the MGF 110-11L Gene in the African Swine Fever Replication and Virulence. *Vaccines* **2023**, *11*, 846, doi:10.3390/vaccines11040846.
149. Sánchez-Cordón, P.J.; Jabbar, T.; Berrezaie, M.; Chapman, D.; Reis, A.; Sastre, P.; Rueda, P.; Goatley, L.; Dixon, L.K. Evaluation of Protection Induced by Immunisation of Domestic Pigs with Deletion Mutant African Swine Fever Virus BeninΔMGF by Different Doses and Routes. *Vaccine* **2018**, *36*, 707–715, doi:10.1016/j.vaccine.2017.12.030.
150. Sastre, P.; Pérez, T.; Costa, S.; Yang, X.; Räber, A.; Blome, S.; Goller, K.V.; Gallardo, C.; Tapia, I.; García, J.; et al. Development of a Duplex Lateral Flow Assay for Simultaneous Detection of Antibodies against *African* and *Classical Swine Fever Viruses*. *J VET Diagn Invest* **2016**, *28*, 543–549, doi:10.1177/1040638716654942.
151. Nowinski, R.C.; Lostrom, M.E.; Tam, M.R.; Stone, M.R.; Burnette, W.N. The Isolation of Hybrid Cell Lines Producing Monoclonal Antibodies against the P15(E) Protein of Ecotropic Murine Leukemia Viruses. *Virology* **1979**, *93*, 111–126, doi:10.1016/0042-6822(79)90280-0.
152. Nakane, P.K.; Kawaoi, A. Peroxidase-labeled antibody a new method of conjugation. *J Histochem Cytochem.* **1974**, *22*, 1084–1091, doi:10.1177/22.12.1084.
153. Zong, Y., Zhang, S., Chen, HT., Zong, Y., Shi, Y. (2007). Forward-Phase and Reverse-Phase Protein Microarray. En: *Microarrays*. Methods in Molecular Biology™, vol 381. Humana Press. ISBN: 978-1-58829-589-7.
154. Hermanson, G.T. Capítulo 14. Microparticles and Nanoparticles. En *Bioconjugate techniques*; Academic Press is an imprint of Elsevier, **2013**. ISBN: 978-0-12-382240-6.
155. Petrini, S.; Righi, C.; Mészáros, I.; D'Errico, F.; Tamás, V.; Pela, M.; Olasz, F.; Gallardo, C.; Fernandez-Pinero, J.; Göltl, E.; et al. The Production of Recombinant African Swine Fever Virus Lv17/WB/Rie1 Strains and Their In Vitro and In Vivo Characterizations. *Vaccines* **2023**, *11*, 1860, doi:10.3390/vaccines11121860.
156. Blome, S.; Staubach, C.; Henke, J.; Carlson, J.; Beer, M. Classical Swine Fever—An Updated Review. *Viruses* **2017**, *9*, 86, doi:10.3390/v9040086.
157. Aira, C.; González-García, G.; Martínez-Cano, J.; De La Roja, N.; Giammarioli, M.; Feliziani, F.; Šteingolde, Ž.; Buitkuviene, J.; Václavek, P.; Glišić, D.; et al. Simultaneous Detection of Antigen and Antibodies of African Swine Fever in a Novel Combo Lateral Flow Assay. *Vaccines* **2024**, *12*, 307, doi:10.3390/vaccines12030307.
158. Aira, C.; Ruiz, T.; Dixon, L.; Blome, S.; Rueda, P.; Sastre, P. Bead-Based Multiplex Assay for the Simultaneous Detection of Antibodies to African Swine Fever Virus and Classical Swine Fever Virus. *Front. Vet. Sci.* **2019**, *6*, 306, doi:10.3389/fvets.2019.00306.
159. Vu, H.L.X.; McVey, D.S. Recent Progress on Gene-Deleted Live-Attenuated African Swine Fever Virus Vaccines. *npj Vaccines* **2024**, *9*, doi:10.1038/s41541-024-00845-9.
160. Paraskevopoulou, V.; Falcone, F. Polyionic Tags as Enhancers of Protein Solubility in Recombinant Protein Expression. *Microorganisms* **2018**, *6*, 47, doi:10.3390/microorganisms6020047.
161. Malm, M.; Kuo, C.-C.; Barzadd, M.M.; Mebrahtu, A.; Wistbacka, N.; Razavi, R.; Volk, A.-L.; Lundqvist, M.; Kotol, D.; Tegel, H.; et al. Harnessing Secretory Pathway Differences between HEK293 and CHO to Rescue Production of Difficult to Express Proteins. *Metabolic Engineering* **2022**, *72*, 171–187, doi:10.1016/j.ymben.2022.03.009.

162. African Swine Fever Virus Biology and Vaccine Approaches. In *Advances in Virus Research*; Elsevier, **2018**; pp. 41–74. ISBN 978-0-12-815201-0.
163. Jancovich, J.K.; Chapman, D.; Hansen, D.T.; Robida, M.D.; Loskutov, A.; Craciunescu, F.; Borovkov, A.; Kibler, K.; Goatley, L.; King, K.; et al. Immunization of Pigs by DNA Prime and Recombinant Vaccinia Virus Boost To Identify and Rank African Swine Fever Virus Immunogenic and Protective Proteins. *J Virol* **2018**, *92*, e02219-17, doi:10.1128/JVI.02219-17.
164. Lu, C.; Liu, C.; Sun, X.; Wan, P.; Ni, J.; Wang, L.; Ji, Y.; Guo, Y.; Lu, S. Bioinformatics Analysis, Codon Optimization and Expression of Ovine Pregnancy Associated Glycoprotein-7 in HEK293 Cells. *Theriogenology* **2021**, *172*, 27–35, doi:10.1016/j.theriogenology.2021.05.027.
165. Owji, H.; Nezafat, N.; Negahdaripour, M.; Hajiebrahimi, A.; Ghasemi, Y. A Comprehensive Review of Signal Peptides: Structure, Roles, and Applications. *European Journal of Cell Biology* **2018**, *97*, 422–441, doi:10.1016/j.ejcb.2018.06.003.
166. Wolfert, M.A.; Boons, G.-J. Adaptive Immune Activation: Glycosylation Does Matter. *Nat Chem Biol* **2013**, *9*, 776–784, doi:10.1038/nchembio.1403.
167. Chapman, D.A.G.; Tcherepanov, V.; Upton, C.; Dixon, L.K. Comparison of the Genome Sequences of Non-Pathogenic and Pathogenic African Swine Fever Virus Isolates. *Journal of General Virology* **2008**, *89*, 397–408, doi:10.1099/vir.0.83343-0.
168. Rodríguez, J.M.; Moreno, L.T.; Alejo, A.; Lacasta, A.; Rodríguez, F.; Salas, M.L. Genome Sequence of African Swine Fever Virus BA71, the Virulent Parental Strain of the Nonpathogenic and Tissue-Culture Adapted BA71V. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0142889, doi:10.1371/journal.pone.0142889.
169. Fan, R.; Wei, Z.; Zhang, M.; Jia, S.; Jiang, Z.; Wang, Y.; Cai, J.; Chen, G.; Xiao, H.; Wei, Y.; et al. Development of Novel Monoclonal Antibodies for Blocking NF-κB Activation Induced by CD2v Protein in African Swine Fever Virus. *Front. Immunol.* **2024**, *15*, doi:10.3389/fimmu.2024.1352404.
170. Liu, S.; Ding, P.; Du, Y.; Ren, D.; Chen, Y.; Li, M.; Sun, X.; Wang, S.; Chang, Z.; Li, R.; et al. Development and Characterization of Monoclonal Antibodies against the Extracellular Domain of African Swine Fever Virus Structural Protein, CD2v. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, doi:10.3389/fmicb.2022.1056117.
171. Liu, H.; Wang, A.; Yang, W.; Liang, C.; Zhou, J.; Chen, Y.; Liu, Y.; Zhou, Y.; Zhang, G. Expression of Extracellular Domain of ASFV CD2v Protein in Mammalian Cells and Identification of B Cell Epitopes. *Virus Research* **2023**, *323*, 199000, doi:10.1016/j.virusres.2022.199000.
172. Kay-Jackson, P.C.; Goatley, L.C.; Cox, L.; Miskin, J.E.; Parkhouse, R.M.E.; Wienands, J.; Dixon, L.K. The CD2v Protein of African Swine Fever Virus Interacts with the Actin-Binding Adaptor Protein SH3P7. *Journal of General Virology* **2004**, *85*, 119–130, doi:10.1099/vir.0.19435-0.
173. Lo, K.M.; Sudo, Y.; Chen, J.; Li, Y.; Lan, Y.; Kong, S.M.; Chen, L.; An, Q.; Gillies, S.D. High Level Expression and Secretion of Fc-X Fusion Proteins in Mammalian Cells. *Protein Engineering Design and Selection* **1998**, *11*, 495–500, doi:10.1093/protein/11.6.495.
174. Liu, C.-H.; Wu, P.-S. Characterization of Matrix Metalloproteinase Expressed by Human Embryonic Kidney Cells. *Biotechnol Lett* **2006**, *28*, 1725–1730, doi:10.1007/s10529-006-9147-y.

175. Chaulagain, S.; Delhon, G.A.; Khatiwada, S.; Rock, D.L. African Swine Fever Virus CD2v Protein Induces β-Interferon Expression and Apoptosis in Swine Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Viruses* **2021**, *13*, 1480, doi:10.3390/v13081480.
176. Mena-Bueno, S.; Garrido, V.; Romero, F.; Zabalza-Baranguá, A.; Grilló, M.J. Rev1Δwzm Vaccine Candidate Is Safe in Young and Adult Sheep and Protects against Brucella Ovis Infection in Rams. *Vaccine* **2024**, *42*, 125998, doi:10.1016/j.vaccine.2024.05.046.
177. Aida, V.; Pliasas, V.C.; Neasham, P.J.; North, J.F.; McWhorter, K.L.; Glover, S.R.; Kyriakis, C.S. Novel Vaccine Technologies in Veterinary Medicine: A Herald to Human Medicine Vaccines. *Front. Vet. Sci.* **2021**, *8*, doi:10.3389/fvets.2021.654289.
178. Roitt, I.M.; Delves, P.J.; Martin, S.J.; Burton, D.R. *Roitt's Essential Immunology*; 12. ed.; Wiley-Blackwell: Oxford, **2011**; ISBN: 978-1-4051-9683-3.
179. *Antibodies: A Laboratory Manual*; Greenfield, E.A., Ed.; 2. ed.; CSH Laboratory Pr: Cold Spring Harbor, 2013; ISBN: 978-1-936113-81-1.
180. Sauter-Louis, C.; Conraths, F.J.; Probst, C.; Blohm, U.; Schulz, K.; Sehl, J.; Fischer, M.; Forth, J.H.; Zani, L.; Depner, K.; et al. African Swine Fever in Wild Boar in Europe—A Review. *Viruses* **2021**, *13*, 1717, doi:10.3390/v13091717.
181. Leeman, M.; Choi, J.; Hansson, S.; Storm, M.U.; Nilsson, L. Proteins and Antibodies in Serum, Plasma, and Whole Blood—Size Characterization Using Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation (AF4). *Anal Bioanal Chem* **2018**, *410*, 4867–4873, doi:10.1007/s00216-018-1127-2.
182. Onyilagha, C.; Nash, M.; Perez, O.; Goolia, M.; Clavijo, A.; Richt, J.A.; Ambagala, A. Meat Exudate for Detection of African Swine Fever Virus Genomic Material and Anti-ASFV Antibodies. *Viruses* **2021**, *13*, 1744, doi:10.3390/v13091744.
183. Mur, L.; Igolkin, A.; Varentsova, A.; Pershin, A.; Remyga, S.; Shevchenko, I.; Zhukov, I.; Sánchez-Vizcaíno, J.M. Detection of African Swine Fever Antibodies in Experimental and Field Samples from the Russian Federation: Implications for Control. *Transbound Emerg Dis* **2016**, *63*, e436–e440, doi:10.1111/tbed.12304.
184. Grau, F.R.; Schroeder, M.E.; Mulhern, E.L.; McIntosh, M.T.; Bounpheng, M.A. Detection of African Swine Fever, Classical Swine Fever, and Foot-and-Mouth Disease Viruses in Swine Oral Fluids by Multiplex Reverse Transcription Real-Time Polymerase Chain Reaction. *J VET Diagn Invest* **2015**, *27*, 140–149, doi:10.1177/1040638715574768.
185. Goonewardene, K.B.; Onyilagha, C.; Goolia, M.; Le, V.P.; Blome, S.; Ambagala, A. Superficial Inguinal Lymph Nodes for Screening Dead Pigs for African Swine Fever. *Viruses* **2022**, *14*, 83, doi:10.3390/v14010083.
186. Rueda Pérez, P.; Sastre Antoranz, P.; Venteo Moreno, Á.; González García, G.; Arias Neira, M.L.; Gallardo Frontaura, C.; Fernández Piñero, J.; Zádori, Z.; Mészáros, I.; Olasz, F.; et al. Method for Differentiating ASFV Infected from ASFV Vaccinated Animals. Patent not yet published.
187. Elshal, M.; Mccoy, J. Multiplex Bead Array Assays: Performance Evaluation and Comparison of Sensitivity to ELISA. *Methods* **2006**, *38*, 317–323, doi:10.1016/j.ymeth.2005.11.010.
188. Zhao, D.; Sun, E.; Huang, L.; Ding, L.; Zhu, Y.; Zhang, J.; Shen, D.; Zhang, X.; Zhang, Z.; Ren, T.; et al. Highly Lethal Genotype I and II Recombinant African Swine Fever Viruses Detected in Pigs. *Nat Commun* **2023**, *14*, doi:10.1038/s41467-023-38868-w.

189. Risatti, G.R.; Borca, M.V. MSD Manual: Veterinary Manual. Classical Swine Fever. **2024**. Disponible en: https://www.msdvetmanual.com/generalized-conditions/classical-swine-fever/classical-swine-fever, accedido 17/09/2024.
190. Pozio, E.; Di Marco Lo Presti, V.; Vicari, D.; Ludovisi, A.; Ciarello, F.P.; Amati, M.; Ippolito, D.; Vesco, G.; Gómez-Morales, M.A. The Detection of Anti-Trichinella Antibodies in Free-Ranging Nebrodi Regional Park Black Pigs from Sicily, Italy, Suggests the Circulation of Trichinella Britovi in the Island. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports* **2021**, *24*, 100578, doi:10.1016/j.vprsr.2021.100578.
191. Sutandy, F.X.R.; Qian, J.; Chen, C.; Zhu, H. Overview of Protein Microarrays. *CP Protein Science* **2013**, *72*, doi:10.1002/0471140864.ps2701s72.
192. Le, V.P.; Nguyen, V.T.; Le, T.B.; Mai, N.T.A.; Nguyen, V.D.; Than, T.T.; Lai, T.N.H.; Cho, K.H.; Hong, S.-K.; Kim, Y.H.; et al. Detection of Recombinant African Swine Fever Virus Strains of P72 Genotypes I and II in Domestic Pigs, Vietnam, 2023. *Emerg. Infect. Dis.* **2024**, *30*, doi:10.3201/eid3005.231775.
193. Zhang, Y.-B.; Howitt, J.; McCorkle, S.; Lawrence, P.; Springer, K.; Freimuth, P. Protein Aggregation during Overexpression Limited by Peptide Extensions with Large Net Negative Charge. *Protein Expression and Purification* **2004**, *36*, 207–216, doi:10.1016/j.pep.2004.04.020.
194. Harper, S., Speicher, D.W. Purification of Proteins Fused to Glutathione S-Transferase. En: P*rotein Chromatography. Methods in Molecular Biology*, vol 681. Humana Press, **2011**; pp. 259–280. ISBN: 978-1-60761-912-3.
195. Tsien, R. The Green Fluorescent Protein. *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *68*, 509–544. doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.509.
196. Arbach, H.; Butler, C.; McMenimen, K.A. Chaperone Activity of Human Small Heat Shock Protein-GST Fusion Proteins. *Cell Stress and Chaperones* **2017**, *22*, 503–515, doi:10.1007/s12192-017-0764-2.
197. Li, Z.; Wu, S.; Ji, J.; Bai, Y.; Jia, P.; Gong, Y.; Feng, S.; Li, F. Ball Pen Writing-without-Ink: A Truly Simple and Accessible Method for Sensitivity Enhancement in Lateral Flow Assays. *RSC Adv.* **2022**, *12*, 2068–2073, doi:10.1039/d1ra07684a.
198. Omidfar, K.; Riahi, F.; Kashanian, S. Lateral Flow Assay: A Summary of Recent Progress for Improving Assay Performance. *Biosensors* **2023**, *13*, 837, doi:10.3390/bios13090837.
199. Danzetta, M.L.; Marenzoni, M.L.; Iannetti, S.; Tizzani, P.; Calistri, P.; Feliziani, F. African Swine Fever: Lessons to Learn From Past Eradication Experiences. A Systematic Review. *Front. Vet. Sci.* **2020**, *7*, doi:10.3389/fvets.2020.00296.
200. Beltrán-Alcrudo, D., Arias, M., Gallardo, C., Kramer, S., Penrith, M.L. African swine fever: detection and diagnosis – A manual for veterinarians. FAO Animal Production and Health Manual No. 19. **2017**, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). ISBN: 978-92-5-109752-6.