

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**Diseño y desarrollo de plataformas innovadoras para  
el diagnóstico de enfermedades infecciosas en ganado  
porcino**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Cristina Aira Pino**

**DIRECTORES**

**Lisett López Morejón  
Víctor Manuel González Muñoz  
Paloma Rueda Pérez**

**Madrid, 2021**

# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

## FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



### TESIS DOCTORAL

Diseño y desarrollo de plataformas innovadoras para el diagnóstico de  
enfermedades infecciosas en ganado porcino

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Cristina Aira Pino

### DIRECTORES

Lissett López Morejón

Víctor Manuel González Muñoz

Paloma Rueda Pérez





**A mis abus Pedro y Paco**

**A mi Goli**



El trabajo que se describe en esta memoria ha sido realizado en la empresa Eurofins-Ingenasa (Inmunología y Genética Aplicada S.A.), en colaboración con el grupo de aptámeros del Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRyCIS), bajo la dirección de los Drs. Lissett López Morejón, Víctor Manuel González Muñoz y Paloma Rueda Pérez.

Dicho trabajo ha sido posible gracias a la financiación recibida dentro de los proyectos:

- Doctorados Industriales de la Comunidad de Madrid (IND201/BMD-7711).
- Consorcio internacional EuroSTARS-MultiDETECT E!1011 con financiación recibida del Centro para el Desarrollo Tecnológico e Industrial (CDTI).

Como resultado de este trabajo de investigación se han publicado los siguientes artículos científicos:

- Bead-Based Multiplex Assay for the Simultaneous Detection of Antibodies to African Swine Fever Virus and Classical Swine Fever Virus. DOI: 10.3389/fvets.2019.00306.
- Development of an antigen Enzyme-Linked AptaSorbent Assay (ELASA) for the detection of Swine Influenza virus in field samples. *Analytica Chimica Acta*. En prensa.
- A multiplex assay for the detection of antibodies to relevant swine pathogens in serum. *Transboundary and Emerging Diseases*. Aceptado. Publicado en formato *pre-print*. DOI: 10.22541/au.161839153.32778893/v1.

Así mismo, se ha establecido una colaboración con el Instituto para Patógenos Nuevos y Emergentes (INNT) del Instituto Estatal Friedrich-Loeffler (FLI), en Greifswald, Alemania, dentro del grupo de investigación dirigido por la Prof. Dra. Anne Balkema-Buschmann para el desarrollo conjunto de ensayos múltiples, intercambiando materiales para la ampliación de los paneles diagnósticos de ambos centros y realizando una estancia en dicho centro.



# Agradecimientos

Y por fin llegó el momento de escribir el final de este trabajo, que ha sido posible gracias a muchísimas personas que me han apoyado en estos años y a lo largo de mi vida.

En primer lugar, tengo que agradecer a mis directores de tesis que confiaran en mí desde el primer momento y que me dieran la oportunidad de realizar este trabajo que tanto me ha permitido crecer apoyándome en cada fase en que les he necesitado. Gracias a Lissett por ser mi madre científica, guiarme y enseñarme mil truquitos en el laboratorio, alegrarse conmigo por cada éxito, empujarme durante las temporadas más difíciles, estar ahí para cualquier cosa, del laboratorio y de fuera, y por enseñarme lo más importante que he aprendido en estos cuatro años, que lo que más vale es el trabajo en equipo y el apoyo de los compañeros. Gracias a Víctor por hacerme sentir una más dentro del grupo de aptámeros siempre, ofrecerse a ser parte de este proyecto sin dudar ni un momento y facilitar cada trámite y cada etapa de este larguísimo proceso. Y gracias a Paloma, por creer en mí, luchar por conseguirme oportunidades y volcarse conmigo sacando tiempo incluso cuando parecía imposible para conseguir terminar esta tesis. Sin vuestra ayuda, no habría conseguido llegar hasta aquí.

Gracias a Antonio, Eduardo, Carmen y Belén por permitirme crecer en Ingenasa y darme la oportunidad de realizar este trabajo en la empresa que ellos vieron nacer y que da la oportunidad de que tantos doctores y apasionados de la ciencia desarrollemos nuestra carrera en este país.

Gracias a mi tutora de la UCM, Isabel de la Mata, por facilitar cada trámite, ayudarme con todos los papeleos y la burocracia, y por darme la oportunidad de realizar mis prácticas en Ingenasa.

Gracias a Nuria y a Tamara que en estos cuatro años se han convertido en grandísimas amigas, diría que familia elegida, con las que compartir todo lo bueno y apoyarnos en las malas, gracias por enseñarme la ciencia B y todo lo que tenía que saber dentro de un laboratorio. A Gabriela, por todos nuestros ratos por las tardes hablando de todo y resolviendo cualquier problema científico, por las risas infinitas y tantísimos consejos de todo tipo, no sé qué he hecho sin ti tanto tiempo. A Kiko y al señor Murciano, por los juernes y los planes improvisados post-PCR, porque con todos vosotros en el labo no hay días malos,

como mucho, días con el Epepe feliz. Y a las locas de azul, Lourdes y Gina, que nos alegran los desayunos y las comidas. Sin todos vosotros, vuestros empujones en los momentos malos y lo bien que me lo hacéis pasar con cada detalle, ir al labo sería mucho más trabajo de lo que es. A Patricia por haber sido casi una directora en la sombra con toda la parte de los ensayos múltiples, por ayudarme a superar mi fobia a escribir, enseñarme tanto y ayudarme a conseguir oportunidades increíbles. A Javi por enseñarnos todo lo que hay que saber en el laboratorio, y a todos mis compañeros de genética: Alexis, Merce, Marga, Luis, Carmen, Helena e Irene, ha sido muy fácil y divertido trabajar con todos vosotros estos años. A Alba por animarme todos los días durante la escritura, por los ratos en el metro hablando de todo y por apoyarme en el mejor congreso del mundo. A Istar por estar siempre ahí para escucharme y darme consejos cuando más la he necesitado. Y a Alex, gracias a los tres por el buen royo que desprendéis y lo que aprendo de inmunocromatografía cada vez que hablo con vosotros. A los compis de desarrollo Angel, y las chicas ELISA (Belén, Isa y Diana), que siempre tienen una solución para nuestros problemas y están dispuestos a echarte una mano en cualquier momento por ocupados que estén. A las chicas de cultivos Isa, Ana, Elena y Esther, por pasarnos anticuerpos frente a cualquier cosa que exista. A toda la gente del 39: M<sup>a</sup> Carmen, Rosa, Eva, Moisés, Rubén, Chusa, Bea, Olga, Luz, Isabel, Javi, Juanjo, Ana, Elena, Carmen, Jacques, Cristina, Carlos, Nacho y a toda la gente nueva que el SARS CoV-2 no nos ha dado la oportunidad de conocer bien todavía. Gracias por ayudarnos con todos los trámites infernales y por hacer que los resultados que salen de nuestros laboratorios vean la luz y cumplan una función real como productos de diagnóstico.

A todos mis compañeros del grupo de aptámeros: Ana, Rebeca, Miriam, Celia, Esther, Ana, Silvia, Elena, Gero, Raquel, Maribel, Marta, Valerio, Alberto, Miguel y muy muy muy especialmente a Nacho, que me ha enseñado todo lo que sé sobre aptámeros y sin el cual no habría conseguido sacar ninguna selección. Gracias por hacerme sentir una más del grupo cada vez que he ido a aprender sobre aptámeros con vosotros y por ilusionaros tanto como yo al vernos (más aún si es con manolitos o en un escape room), siempre es un placer pasar un rato con vosotros.

Thanks to Anne for the opportunity to collaborate with her group at the FLI and to all my colleagues there: Maren, Dan, Julia, Ola, and Nicole, for the best time someone can have in a new lab, and for all the plans and support in the tough time, when the COVID crisis started.

A mis padres que siempre me han apoyado y me han animado a seguir el camino que más me motivara, por muy dura que pareciera la carrera científica, gracias por confiar en mí, darme todas las oportunidades del mundo y apoyarme en los momentos de desmotivación, gracias por todo lo que me habéis enseñado y por vuestra ayuda incansable en cada fase y en cada problema de todos los aspectos de mi vida. A mí pequeñajo, Alex, por quererme y chincharme a partes iguales desde 1.999, eres una parte fundamental de mi vida y no sé que habría hecho sin ti en tantísimas ocasiones que ni las puedo contar. A mis abuelos, los mejores abuelos que se pueden tener, gracias por presumir de nieta, aprenderos lo que estudiaba por difícil que pareciera de explicar o pronunciar, hacerme sentir especial y darme apoyo y cariño incondicional siempre. A Marcos, por hacerme ver lo mejor de mí, apoyarme en todo, interesarte por los royos científicos que te suelto cada dos por tres, escucharme los ensayos de presentaciones y porque se cumplan todos nuestros planes de futuro juntos. Y a mi mejor amigo que me acompañó desde los 10 años, Goli, enseñándome lo incondicional que puede llegar a ser el cariño. Gracias por ser como sois conmigo, **OS QUIERO HASTA EL INFINITO Y MÁS ALLÁ.**

A las mejores amigas que se puede tener. A mis GORDIS, por ser un apoyo fundamental desde el instituto, por todas nuestras anécdotas desde que éramos jóvenes y mandaba la fiesta y por motivarnos unas a otras siempre, hasta que nos hagamos mayores con churumbeles, o seamos abuelitas en un patio fresco y dejemos atrás los motes (si es que eso es posible), me enorgullece crecer a vuestro lado. Sobretudo a Ángela, que literalmente nos hemos visto crecer desde el primer verano de nuestra vida xD, por los ratos interminables en la biblioteca en época de exámenes, por aguantarme con mis agobios y escuchar todas mis chapas. A mis CHULIS, por nuestras noches inmejorables de desconexión de la bioquímica, las risas infinitas y los ratos de estudio en la biblioteca de químicas, biológicas, o en la que hubiera un huequito, porque por mucho tiempo que pase entre las quedadas es como si nos hubiéramos visto ayer mismo. Especialmente a mi Macu, que no se qué haría sin sus mimos y sus palabras bonitas, esa persona para la que estar y que está para ti pase lo que pase, cuando somos listas y cuando no tanto. Y a mi Roci, por las risas, las fiestas y el apoyo, las confianzas, la que siempre saca un rato cuando la necesito para tomarnos una cerveza o hacer un rato el ridi.

**GRACIAS A TODOS POR VUESTRO APOYO Y POR FORMAR PARTE DE MI VIDA.**



# Índice

|                    |      |
|--------------------|------|
| Abreviaturas ..... | XIII |
| Resumen .....      | XVII |
| Abstract .....     | XXI  |

## I. Introducción

|  |    |
|--|----|
| I. 1. Industria porcina.....   | 1  |
| I. 2. Enfermedades infecciosas y respuesta inmune .....  | 3  |
| I. 3. Diagnóstico de enfermedades infecciosas.....   | 9  |
| I. 4. Obtención de herramientas moleculares para el desarrollo de<br>ensayos diagnósticos..... | 12 |
| I. 4. 1 Antígenos recombinantes .....  | 12 |
| I. 4. 2 Moléculas detectoras. Anticuerpos monoclonales y aptámeros.....                        | 17 |
| I. 5. Inmunoensayos diagnósticos.....  | 21 |
| I. 6. Patologías de interés en ganado porcino .....  | 31 |
| I. 6. 1 Patologías digestivas .....  | 31 |
| I. 6. 2 Patologías respiratorias .....   | 32 |
| I. 6. 3 Otras patologías relevantes en ganado porcino .....                                    | 37 |

|                            |           |
|----------------------------|-----------|
| <b>II. Objetivos</b> ..... | <b>47</b> |
|----------------------------|-----------|

## III. Materiales y métodos

|   |    |
|---|----|
| III. 1. Materiales .....                    | 51 |
| III. 1. 1 Virus.....                        | 51 |
| III. 1. 2 Bacterias .....                   | 51 |
| III. 1. 3 Líneas celulares .....            | 52 |
| III. 1. 4 Animales de experimentación ..... | 52 |

|               |  |    |
|---------------|--|----|
| III. 1. 5     | Medios de cultivo .....                          | 53 |
| III. 1. 5. 1  | Medios de cultivo para bacterias .....           | 53 |
| III. 1. 5. 2  | Medios de cultivo para células de insecto .....  | 53 |
| III. 1. 5. 3  | Medios de cultivo para células de mamífero ..... | 53 |
| III. 1. 6     | Anticuerpos monoclonales.....                    | 54 |
| III. 1. 7     | Oligonucleótidos.....                            | 55 |
| III. 1. 7. 1  | Cebadores específicos.....                       | 55 |
| III. 1. 7. 2  | Cebadores generales .....                        | 55 |
| III. 1. 8     | Plásmidos.....                                   | 56 |
| III. 1. 9     | Aptámeros.....                                   | 56 |
| III. 1. 10    | Reactivos, soluciones y tampones .....           | 57 |
| III. 1. 11    | Muestras biológicas .....                        | 60 |
| III. 1. 11. 1 | Muestras digestivas porcinas .....               | 60 |
| III. 1. 11. 2 | Muestras del tracto respiratorio porcinas.....   | 60 |
| III. 1. 11. 3 | Muestras de suero porcinas.....                  | 61 |
| III. 2.       | Métodos .....                                    | 63 |
| III. 2. 1     | Manipulación de líneas celulares y virus.....    | 63 |
| III. 2. 1. 1  | Propagación de células de mamífero .....         | 63 |
| III. 2. 1. 2  | Crecimiento de virus en cultivo celular .....    | 63 |
| III. 2. 1. 3  | Propagación de hibridomas.....                   | 64 |
| III. 2. 1. 4  | Propagación de células de insecto .....          | 64 |
| III. 2. 2     | Obtención y manejo de ácidos nucleicos.....      | 64 |
| III. 2. 2. 1  | Extracción ARN a partir de inóculo viral .....   | 64 |
| III. 2. 2. 2  | Extracción ADN a partir de inóculo viral.....    | 65 |
| III. 2. 2. 3  | Retrotranscripción (RT).....                     | 65 |
| III. 2. 2. 4  | Reacción en cadena de la polimerasa, PCR.....    | 65 |
| III. 2. 2. 5  | Electroforesis en geles de agarosa .....         | 66 |
| III. 2. 2. 6  | Diseño de genes sintéticos .....                 | 66 |
| III. 2. 2. 7  | Secuenciación de ADN.....                        | 66 |

|                 |  |    |
|-----------------|--|----|
| III. 2. 3       | Construcción de plásmidos .....  | 67 |
| III. 2. 3. 1    | Plásmido de clonaje pCR <sup>TM</sup> 8/GW/TOPO®.....  | 67 |
| III. 2. 3. 2    | Producción de plásmidos.....   | 67 |
| III. 2. 3. 3    | Plásmidos de expresión. Sistema Gateway .....  | 67 |
| III. 2. 3. 4    | Plásmido de expresión pET28A-SUMO .....  | 68 |
| III. 2. 4       | Manipulación de bacterias.....   | 68 |
| III. 2. 4. 1    | Mantenimiento y crecimiento de <i>E. coli</i> .....  | 68 |
| III. 2. 4. 2    | Transformación de <i>E. coli</i> .....   | 68 |
| III. 2. 4. 3    | Selección de clones por PCR .....  | 69 |
| III. 2. 4. 4    | Selección de condiciones óptimas para la expresión en bacteria....                           | 69 |
| III. 2. 5       | Manipulación de baculovirus .....  | 70 |
| III. 2. 5. 1    | Obtención de baculovirus recombinantes .....   | 70 |
| III. 2. 5. 2    | Aislamiento de clones de baculovirus.....  | 71 |
| III. 2. 5. 3    | Selección de baculovirus recombinantes .....   | 72 |
| III. 2. 5. 4    | Propagación de baculovirus .....   | 72 |
| III. 2. 5. 5    | Selección de condiciones óptimas para la expresión en células de insecto .....               | 72 |
| III. 2. 6       | Preparación y análisis de extractos proteicos.....   | 73 |
| III. 2. 6. 1    | Obtención de extractos proteicos de células de insecto .....                                 | 73 |
| III. 2. 6. 2    | Electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)..... | 73 |
| III. 2. 6. 3    | Tinción con azul de Coomassie.....   | 73 |
| III. 2. 6. 4    | Tinción de ácido periódico-Schiff (PAS).....   | 73 |
| III. 2. 6. 5    | Inmunodetección en membranas de nitrocelulosa ( <i>western blot</i> )...                     | 74 |
| III. 2. 6. 6    | Microscopía electrónica .....  | 74 |
| III. 2. 7       | Purificación de proteínas.....   | 75 |
| III. 2. 7. 1    | Purificación a partir de la fracción insoluble de las células .....                          | 75 |
| III. 2. 7. 1. 1 | Solubilización mediante sarcosilo.....   | 75 |
| III. 2. 7. 1. 2 | Solubilización mediante cloruro de guanidinio .....  | 75 |
| III. 2. 7. 1. 3 | Solubilización mediante urea .....   | 76 |

|                  |  |    |
|------------------|--|----|
| III. 2. 7. 2     | Purificación por columnas de afinidad .....                                  | 76 |
| III. 2. 7. 2. 1  | Purificación a partir de péptidos de fusión .....                            | 76 |
| III. 2. 7. 2. 2  | Purificación mediante AcMs .....   | 76 |
| III. 2. 7. 3     | Purificación por ultracentrifugación .....                                   | 77 |
| III. 2. 8        | Obtención de anticuerpos monoclonales .....                                  | 78 |
| III. 2. 8. 1     | Inmunización de ratones BALB/c .....   | 78 |
| III. 2. 8. 2     | Fusión celular. Obtención de hibridomas .....                                | 78 |
| III. 2. 8. 3     | Producción de AcMs.....  | 79 |
| III. 2. 8. 4     | Caracterización de AcMs.....   | 80 |
| III. 2. 8. 5     | Marcaje de AcMs.....   | 80 |
| III. 2. 8. 5. 1  | Marcaje con biotina .....  | 80 |
| III. 2. 8. 5. 2  | Marcaje con peroxidasa .....   | 81 |
| III. 2. 9        | Obtención de aptámeros .....   | 81 |
| III. 2. 9. 1     | Selección de aptámeros. SELEX .....  | 81 |
| III. 2. 9. 2     | Marcaje de aptámeros .....   | 83 |
| III. 2. 9. 3     | Clonaje de la población de aptámeros .....                                   | 83 |
| III. 2. 9. 4     | Selección de clones.....   | 83 |
| III. 2. 9. 5     | Caracterización de aptámeros .....   | 83 |
| III. 2. 10       | Inmunoensayos .....  | 84 |
| III. 2. 10. 1    | Inmunoensayos enzimáticos (ELISA) .....                                      | 84 |
| III. 2. 10. 1. 1 | ELISA directo .....  | 84 |
| III. 2. 10. 1. 2 | ELISA indirecto.....   | 85 |
| III. 2. 10. 1. 3 | ELISA de competición .....   | 85 |
| III. 2. 10. 1. 4 | ELISA sándwich doble anticuerpo, DAS-ELISA .....                             | 85 |
| III. 2. 10. 2    | Aptaensayos enzimáticos.....   | 86 |
| III. 2. 10. 2. 1 | Ensayo indirecto de reconocimiento por aptámero ligado a enzima, ELONA ..... | 86 |
| III. 2. 10. 2. 2 | Ensayo de apta-absorción ligado a enzimas, ELASA .....                       | 86 |
| III. 2. 10. 3    | Inmunofluorescencia.....   | 87 |
| III. 2. 10. 4    | Microarrays en suspensión (Luminex) .....                                    | 88 |
| III. 2. 11       | Análisis estadístico .....   | 89 |

## IV. Resultados

|  |     |
|--|-----|
| IV. 1. Desarrollo de ensayos de detección de antígeno en muestras digestivas empleando aptámeros .....   | 93  |
| IV. 1. 1 Clonaje, expresión y purificación de proteínas recombinantes.....   | 94  |
| IV. 1. 2 Selección de aptámeros específicos frente a la VP6 .....  | 104 |
| IV. 1. 3 Desarrollo de inmunoensayos ELASA para la detección de antígeno en muestras.....  | 107 |
| IV. 2. Desarrollo de ensayos de detección de antígeno en muestras respiratorias empleando aptámeros .....  | 113 |
| IV. 2. 1 Virus Influenza porcina (SIV).....  | 115 |
| IV. 2. 1. 1 Nucleoproteína SIV.....  | 115 |
| IV. 2. 1. 2 Selección de aptámeros .....   | 117 |
| IV. 2. 1. 3 Desarrollo de ensayos ELASA.....   | 120 |
| IV. 2. 2 <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> .....   | 125 |
| IV. 2. 2. 1 Proteína P46 <i>M. hyopneumoniae</i> .....   | 125 |
| IV. 2. 2. 2 Desarrollo de ensayos DAS-ELISA.....   | 127 |
| IV. 2. 2. 3 Selección de aptámeros .....   | 129 |
| IV. 2. 2. 4 Desarrollo de ensayos ELASA.....   | 132 |
| IV. 2. 3 Circovirus porcino tipo 2 (PCV2).....   | 135 |
| IV. 2. 3. 1 Proteína de la cápsida PCV2.....   | 135 |
| IV. 2. 3. 2 Selección de aptámeros .....   | 138 |
| IV. 2. 3. 3 Desarrollo de ensayos ELASA.....   | 141 |
| IV. 2. 4 Virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV).....   | 143 |
| IV. 2. 4. 1 Proteína N de PRRSV .....  | 143 |
| IV. 2. 4. 2 Selección de aptámeros .....   | 144 |
| IV. 2. 4. 3 Desarrollo de ensayos ELASA.....   | 148 |
| IV. 3. Obtención y caracterización de anticuerpos monoclonales específicos frente a la proteína VP30 de ASFV y su potencial uso como herramientas diagnósticas ..... | 153 |
| IV. 3. 1 Obtención de VP30 para inmunización de ratones .....  | 153 |
| IV. 3. 2 Anticuerpos monoclonales .....  | 154 |

|  |     |
|--|-----|
| IV. 4. Diseño y desarrollo de ensayos múltiples para la detección de anticuerpos frente a patologías de interés epidemiológico en ganado porcino ..... | 161 |
| IV. 4. 1 Desarrollo de un ensayo triple para la detección de anticuerpos frente a ASFV y CSFV .....  | 161 |
| IV. 4. 2 Desarrollo de un ensayo séxtuple para la detección de anticuerpos frente a <i>M. bovis</i> , SIV, PRRSV, HEV, ASFV y CSFV. ....               | 167 |
| <b>V. Discusión</b> .....  | 175 |
| <b>VI. Conclusiones</b> .....  | 207 |
| <b>VII. Bibliografía</b> .....   | 211 |
| <b>Anexo I.</b> Mapas de los plásmidos empleados .....   | 235 |
| <b>Anexo II.</b> Secuencias de aminoácidos de las proteínas recombinantes...   | 239 |
| <b>Anexo III.</b> Publicaciones .....  | 247 |

# Índice de figuras

## I. Introducción

|                    |  |    |
|--------------------|--|----|
| <b>FIGURA I.1</b>  | Producción mundial de proteína animal.....   | 2  |
| <b>FIGURA I.2</b>  | Esquema de la estructura bidimensional de las distintas inmunoglobulinas.....  | 6  |
| <b>FIGURA I.3</b>  | Variación cualitativa de carga viral, citoquinas e inmunoglobulinas IgG e IgM tras la entrada de un patógeno en el organismo. .... | 7  |
| <b>FIGURA I.4</b>  | Comparativa de los distintos sistemas heterólogos de expresión ....  | 15 |
| <b>FIGURA I.5</b>  | Esquema de la secuencia de reconocimiento de ligando por un aptámero.....  | 20 |
| <b>FIGURA I.6</b>  | Esquema de un ELISA indirecto.....   | 22 |
| <b>FIGURA I.7</b>  | Esquema de un DAS-ELISA.....   | 23 |
| <b>FIGURA I.8</b>  | Esquema de un ELISA de competición para la detección de anticuerpos .....  | 24 |
| <b>FIGURA I.9</b>  | Esquema de varios formatos de ELISA tipo sándwich .....  | 27 |
| <b>FIGURA I.10</b> | Tecnología Luminex de microarrays en suspensión. ....  | 30 |
| <b>FIGURA I.11</b> | Rotavirus porcino .....  | 32 |
| <b>FIGURA I.12</b> | Virus Influenza.....   | 33 |
| <b>FIGURA I.13</b> | Circovirus porcino tipo 2 .....  | 35 |
| <b>FIGURA I.14</b> | Virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino.....  | 36 |
| <b>FIGURA I.15</b> | Virus de la peste porcina africana .....   | 38 |
| <b>FIGURA I.16</b> | Virus de la peste porcina clásica .....  | 40 |
| <b>FIGURA I.17</b> | Virus de la hepatitis E .....  | 43 |

### III. Resultados

|                     |  |    |
|---------------------|--|----|
| <b>FIGURA III.1</b> | Transferencia <i>in vivo</i> de genes al genoma de baculovirus BacPAK6 ..... | 70 |
| <b>FIGURA III.2</b> | Esquema de la intervención en el metabolismo celular del medio HAT .....     | 79 |
| <b>FIGURA III.3</b> | Esquema del procedimiento SELEX .....  | 82 |

### IV. Resultados

|                     |  |     |
|---------------------|--|-----|
| <b>FIGURA IV.1</b>  | Cultivo de PRVA sobre monocapa de células MA104 .....  | 94  |
| <b>FIGURA IV.2</b>  | Amplificación del gen codificante de la proteína VP6 de PRVA ....                                    | 94  |
| <b>FIGURA IV.3</b>  | Resumen esquemático de las distintas proteínas VP6 recombinantes .....                               | 95  |
| <b>FIGURA IV.4</b>  | Cinética de expresión de la proteína VP6 en células de <i>E. coli</i> .....                          | 96  |
| <b>FIGURA IV.5</b>  | Purificación a partir de cuerpos de inclusión bacterianos de la proteína VP6.....                    | 97  |
| <b>FIGURA IV.6</b>  | Análisis de la expresión de la proteína VP6 (AcHLTA+VP6).....  | 98  |
| <b>FIGURA IV.7</b>  | Cinética de expresión de la proteína 6xHis-VP6 en células Sf9 .....                                  | 99  |
| <b>FIGURA IV.8</b>  | Cuantificación mediante SDS-PAGE de las proteínas 6xHis-VP6 (AcHLTA+VP6) y VP6 (AcBacPAK8+VP6) ..... | 100 |
| <b>FIGURA IV.9</b>  | Cinética de expresión de la proteína VP6 en células Sf900 .....                                      | 101 |
| <b>FIGURA IV.10</b> | Cuantificación de la proteína VP6 expresada en células Sf900 .....                                   | 102 |
| <b>FIGURA IV.11</b> | Fotografías de microscopía electrónica de la proteína VP6 recombinante .....                         | 102 |
| <b>FIGURA IV.12</b> | Evaluación de inmunogenicidad de las proteínas VP6 de PRVA ..  | 103 |
| <b>FIGURA IV.13</b> | Evaluación de poblaciones SELEX frente a la VP6 mediante ELONA.....                                  | 105 |

|                     |   |     |
|---------------------|---|-----|
| <b>FIGURA IV.14</b> | Evaluación mediante ELONA de clones de aptámeros aislados frente a la VP6.....                        | 105 |
| <b>FIGURA IV.15</b> | Evaluación AcMs frente a la VP6 en ELASA .....  | 108 |
| <b>FIGURA IV.16</b> | Evaluación de aptámeros de PRVA en ELASA .....  | 109 |
| <b>FIGURA IV.17</b> | Comparación entre la sensibilidad analítica del ELASA y del DAS-ELISA de PRVA.....                    | 110 |
| <b>FIGURA IV.18</b> | Correlación entre ELASA y DAS-ELISA para detección de antígeno de PRVA .....                          | 111 |
| <b>FIGURA IV.19</b> | Análisis mediante SDS-PAGE de la NP de SIV.....   | 116 |
| <b>FIGURA IV.20</b> | Evaluación de poblaciones SELEX frente a la NP de SIV mediante ELONA .....                            | 117 |
| <b>FIGURA IV.21</b> | ELONA de clones de aptámeros aislados frente a NP de SIV.....   | 118 |
| <b>FIGURA IV.22</b> | Selección de condiciones óptimas para el ELASA de SIV.....  | 120 |
| <b>FIGURA IV.23</b> | Análisis mediante curva ROC de resultados ELASA SIV .....   | 122 |
| <b>FIGURA IV.24</b> | Diagrama de cajas de las muestras de SIV analizadas mediante ELASA.....                               | 123 |
| <b>FIGURA IV.25</b> | Análisis mediante SDS-PAGE de la proteína P46 de <i>M. hyopneumoniae</i> .....                        | 126 |
| <b>FIGURA IV.26</b> | Evaluación de AcMs de <i>M. hyopneumoniae</i> en DAS-ELISA .....                                      | 127 |
| <b>FIGURA IV.27</b> | Análisis mediante curva ROC de los resultados del DAS-ELISA de <i>M. hyopneumoniae</i> .....          | 128 |
| <b>FIGURA IV.28</b> | Evaluación de poblaciones SELEX frente a la P46 de <i>M. hyopneumoniae</i> mediante ELONA .....       | 129 |
| <b>FIGURA IV.29</b> | Evaluación mediante ELONA de clones de aptámeros aislados frente a la proteína P46.....               | 130 |
| <b>FIGURA IV.30</b> | Evaluación de aptámeros específicos frente a la P46 en ELASA..  | 132 |
| <b>FIGURA IV.31</b> | Comparación entre la sensibilidad analítica del DAS-ELISA y el ELASA de <i>M. hyopneumoniae</i> ..... | 133 |

|                     |  |     |
|---------------------|--|-----|
| <b>FIGURA IV.32</b> | Análisis mediante curva ROC de los resultados del ELASA de <i>M. hyopneumoniae</i> ..... | 134 |
| <b>FIGURA IV.33</b> | Cultivo de PCV2 sobre monocapa de células VERO.....                                      | 136 |
| <b>FIGURA IV.34</b> | Amplificación del gen codificante de la proteína Cap de PCV2....                         | 136 |
| <b>FIGURA IV.35</b> | Purificación de la proteína Cap .....  | 137 |
| <b>FIGURA IV.36</b> | Fotografía de microscopía electrónica de las VLPs de PCV2.....                           | 138 |
| <b>FIGURA IV.37</b> | Evaluación de poblaciones SELEX de la Cap mediante ELONA..                               | 139 |
| <b>FIGURA IV.38</b> | Evaluación mediante ELONA de clones de aptámeros aislados frente a la proteína Cap ..... | 139 |
| <b>FIGURA IV.39</b> | Evaluación de aptámeros específicos frente a la Cap de PCV2 en ELASA .....               | 142 |
| <b>FIGURA IV.40</b> | Análisis mediante SDS-PAGE de las proteínas N de PRRSV .....                             | 144 |
| <b>FIGURA IV.41</b> | Evaluación mediante ELONA de rondas SELEX frente a la proteína N de PRRSV.....           | 145 |
| <b>FIGURA IV.42</b> | Evaluación de clones aislados de aptámeros frente a PRRSV mediante ELONA.....            | 146 |
| <b>FIGURA IV.43</b> | Titulación proteína N PRRSV-1 y PRRSV-2 mediante ELASA ..                                | 148 |
| <b>FIGURA IV.44</b> | Análisis mediante curva ROC de los resultados del ELASA de PRRSV.....                    | 149 |
| <b>FIGURA IV.45</b> | Análisis mediante curva ROC de los resultados del ELASA de PRRSV tras optimización ..... | 151 |
| <b>FIGURA IV.46</b> | Análisis de la proteína VP30 de ASFV mediante SDS-PAGE .....                             | 154 |
| <b>FIGURA IV.47</b> | Fotografías de microscopía óptica del crecimiento de hibridomas                          | 155 |
| <b>FIGURA IV.48</b> | Evaluación de AcMs frente a la proteína VP30 en <i>western blot</i> .....                | 156 |
| <b>FIGURA IV.49</b> | Inmunofluorescencia con los AcMs específicos frente a la VP30 .                          | 157 |
| <b>FIGURA IV.50</b> | Titulación de sueros de referencia en ensayo triple.....                                 | 162 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>FIGURA IV.51</b>   Análisis mediante curva ROC de los resultados del ensayo triple ASFV/CSFV ..... | 164 |
| <b>FIGURA IV.52</b>   Análisis estratificado de las muestras de ASFV .....                            | 166 |
| <b>FIGURA IV.53</b>   Análisis mediante curva ROC de parámetros del ensayo séxtuple                   | 169 |

# Índice de tablas

## III. Materiales y métodos

|  |    |
|--|----|
| <b>TABLA III.1</b>   Características principales de los AcMs empleados en el presente trabajo.....                                 | 54 |
| <b>TABLA III.2</b>   Cebadores específicos empleados en la PCR de los genes de interés .....                                       | 55 |
| <b>TABLA III.3</b>   Características de los plásmidos de expresión empleados .....   | 56 |
| <b>TABLA III.4</b>   Reactivos comerciales empleados.....  | 57 |
| <b>TABLA III.5</b>   Soluciones y tampones.....  | 58 |
| <b>TABLA III.6</b>   Muestras porcinas de patógenos respiratorios .....  | 60 |
| <b>TABLA III.7</b>   Características de las muestras de sueros porcinos .....  | 61 |
| <b>TABLA III.8</b>   Características principales de los anticuerpos comerciales empleados en el isotipado de inmunoglobulinas..... | 80 |

## IV. Resultados

|                    |  |     |
|--------------------|--|-----|
| <b>TABLA IV.1</b>  | Características de los aptámeros seleccionados frente a la proteína VP6 de PRVA (media $\pm$ desviación estándar, SD) .....                          | 106 |
| <b>TABLA IV.2</b>  | Técnicas disponibles para el diagnóstico directo de los principales agentes causales de infección primaria en el complejo respiratorio porcino ..... | 114 |
| <b>TABLA IV.3</b>  | Características de los aptámeros seleccionados frente a la NP de SIV (media $\pm$ SD) .....  | 119 |
| <b>TABLA IV.4</b>  | Características del ELASA para detección de antígeno de SIV .....  | 124 |
| <b>TABLA IV.5</b>  | Valores de sensibilidad y especificidad obtenidos en el ensayo interlaboratorio para el ELASA de SIV desarrollado.....                               | 124 |
| <b>TABLA IV.6</b>  | Características de los aptámeros seleccionados frente a la proteína MPB83 de <i>M. hyopneumoniae</i> (media $\pm$ SD).....                           | 131 |
| <b>TABLA IV.7</b>  | Características de los aptámeros seleccionados frente a la proteína Cap de PCV2 (media $\pm$ SD) .....   | 140 |
| <b>TABLA IV.8</b>  | Tratamiento de muestras para maximizar la detección de PCV2...   | 142 |
| <b>TABLA IV.9</b>  | Características de los aptámeros seleccionados frente a la N quimera de PRRSV (media $\pm$ SD) .....   | 146 |
| <b>TABLA IV.10</b> | Especificidad de los aptámeros seleccionados empleando la proteína N quimera de PRRSV frente a las proteínas N de ambas especies                     | 147 |
| <b>TABLA IV.11</b> | Combinación de los nuevos AcMs obtenidos frente a la VP30 en DAS-ELISA.....  | 158 |
| <b>TABLA IV.12</b> | ELISA de competición para la detección de anticuerpos específicos frente a ASFV: Resultados obtenidos.....   | 159 |
| <b>TABLA IV.13</b> | Correlación entre el ensayo múltiple y los ELISA empleados como técnica de referencia .....  | 165 |

# Abreviaturas

|                         |  |
|-------------------------|--|
| <b>A<sub>450</sub></b>  | Absorbancia a 450 nm   |
| <b>AcM</b>              | Anticuerpo monoclonal  |
| <b>AcP</b>              | Anticuerpo policlonal  |
| <b>AcMNPV</b>           | Nucleopoliédrovirus múltiple de <i>Autographa californica</i>  |
| <b>ADN</b>              | Acido desoxirribonucleico  |
| <b>ADNc</b>             | ADN complementario   |
| <b>ADNss</b>            | ADN de cadena sencilla   |
| <b>ADNds</b>            | ADN de cadena doble  |
| <b>ARN</b>              | Ácido ribonucleico   |
| <b>ARNss</b>            | ARN de cadena sencilla   |
| <b>ARNds</b>            | ARN de cadena doble  |
| <b>ASF</b>              | Peste porcina africana (de las siglas en inglés <i>African Swine Fever</i> )                                     |
| <b>ASFV</b>             | Virus de la peste porcina africana (de las siglas en inglés <i>African Swine Fever Virus</i> )                   |
| <b>BDV</b>              | Virus de la enfermedad de la frontera (de las siglas en inglés <i>Border Disease Virus</i> )                     |
| <b>BSL2</b>             | Nivel de bioseguridad 2 (de las siglas en inglés <i>BioSecurity Level 2</i> )                                    |
| <b>BVDV</b>             | Virus de la diarrea viral bovina (de las siglas en inglés <i>Bovine Viral Diarrhea Virus</i> )                   |
| <b>BVES</b>             | Sistema de expresión basado en baculovirus (de las siglas en inglés <i>BaculoVirus Expression System</i> )       |
| <b>CSF</b>              | Peste porcina clásica (de las siglas en inglés <i>Classical Swine Fever</i> )                                    |
| <b>CSFV</b>             | Virus de la peste porcina clásica  |
| <b>Ct</b>               | Ciclo límite en qPCR (de las siglas en inglés <i>Cycle treshold</i> )  |
| <b>dNTPs</b>            | Desoxirribonucleótidos trifosfato  |
| <b>DO<sub>600</sub></b> | Densidad óptica a 600 nm   |
| <b>DMSO</b>             | Dimetilsulfóxido   |
| <b>DS</b>               | Desviación estándar  |
| <b>ELISA</b>            | Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (de las siglas en inglés <i>Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay</i> ) |

|              |   |
|--------------|---|
| <b>ELASA</b> | Ensayo ligado a enzima por apta-absorción (de las siglas en inglés <i>Enzyme-Linked Apta-Sorbent Assay</i> )  |
| <b>ELONA</b> | Ensayo de oligonucleótido ligados a enzima (de las siglas en inglés <i>Enzyme-Linked OligoNucleotide Assay</i> )  |
| <b>FAO</b>   | Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura (de las siglas en inglés <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> ) |
| <b>HGPRT</b> | Hipoxantina-Guanina fosforibosiltransferasa   |
| <b>GW</b>    | Gateway   |
| <b>IHA</b>   | Inmunohistoquímica  |
| <b>IFA</b>   | Inmunofluorescencia   |
| <b>Ig</b>    | Inmunoglobulina   |
| <b>LFA</b>   | Ensayo de inmunocromatografía de flujo lateral (de las siglas en inglés <i>Lateral Flow Assay</i> )   |
| <b>NGS</b>   | Secuenciación masiva (de las siglas en inglés <i>Next Generation Sequencing</i> )   |
| <b>OIE</b>   | Organización mundial de sanidad animal  |
| <b>OMS</b>   | Organización Mundial de la Salud  |
| <b>ONU</b>   | Organización de las Naciones Unidas   |
| <b>pb</b>    | Pares de bases  |
| <b>PCR</b>   | Reacción en cadena de la polimerasa (de las siglas en inglés <i>Polimerase-Chain Reaction</i> )   |
| <b>PCV2</b>  | Circovirus porcino tipo 2 (de las siglas en inglés <i>Porcine CircoVirus type 2</i> )   |
| <b>PEDV</b>  | Virus porcino de la diarrea epidémica (de las siglas en inglés <i>Porcine Epidemic Diarrhea Virus</i> )   |
| <b>PM</b>    | Peso molecular  |
| <b>PO</b>    | Peroxidasa  |
| <b>POC</b>   | Ensayo de uso en el punto de toma de muestra (de las siglas en inglés <i>Point Of Care</i> )  |
| <b>PRDC</b>  | Complejo respiratorio porcino (de las siglas en inglés <i>Porcine Respiratory Disease Complex</i> )   |

|                 |  |
|-----------------|--|
| <b>PRRSV</b>    | Virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (de las siglas en inglés <i>Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus</i> )                 |
| <b>PRVA</b>     | Rotavirus porcino tipo A (de las siglas en inglés <i>Porcine Rotavirus type A</i> )  |
| <b>ROC</b>      | Característica Operativa del Receptor (de las siglas en inglés <i>Receiver Operating Characteristic</i> )  |
| <b>SDS-PAGE</b> | Electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes   |
| <b>SELEX</b>    | Evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (del acrónimo en inglés <i>Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment</i> ) |
| <b>SIV</b>      | Virus Influenza porcino (de las siglas en inglés <i>Swine Influenza Virus</i> )  |
| <b>Sn</b>       | Sensibilidad   |
| <b>Sp</b>       | Especificidad  |
| <b>SUMO</b>     | Pequeño modificador tipo-ubiquitina (del acrónimo en inglés <i>Small Ubiquitin-like MOdifier</i> )   |
| <b>TGEV</b>     | Virus de la Gastroenteritis transmisible (de las siglas en inglés <i>Transmissible GastroEnteritis Virus</i> )   |
| <b>TQ</b>       | Timidina Quinasa   |
| <b>WAHIS</b>    | Sistema de información mundial de sanidad animal (de las siglas en inglés <i>World Animal Health Information System</i> )                                    |



# Resumen

La industria porcina genera un tercio de la proteína de origen animal consumida mundialmente, y supone la fuente total o parcial de ingresos de millones de personas en todo el mundo, tratándose, por tanto, de un sector clave en la economía mundial. Por ello, se hace evidente la necesidad de garantizar la sostenibilidad de dicha producción, así como la seguridad alimentaria y el bienestar animal, para lo cual, un punto clave radica en el control de las enfermedades infecciosas y los agentes causales que afectan a la cabaña porcina. Durante las últimas décadas, la expansión y los cambios estructurales experimentados por este sector han hecho que los agentes patógenos aumenten su difusión y, con ello, su impacto sobre la industria. Para minimizar dicho impacto, la mejor estrategia es la prevención a través de la implementación de herramientas diagnósticas fiables que permitan trazar la evolución de los patógenos y actuar de manera temprana ante los brotes, combinado con la bioseguridad en las granjas y la utilización de vacunas.

En este contexto, el principal objetivo del presente trabajo de tesis ha sido investigar y ampliar las herramientas de diagnóstico directo e indirecto disponibles, y complementar aquellas necesidades identificadas en el diagnóstico de enfermedades infecciosas que afectan al ganado porcino.

En primer lugar, se han desarrollado nuevos métodos de diagnóstico directo (detección de antígeno) para algunos de los patógenos más relevantes que afectan a la industria porcina, como son el Rotavirus porcino tipo A (PRVA), un patógeno digestivo, y los patógenos que causan infecciones primarias en el complejo respiratorio porcino (PRDC): virus Influenza porcino (SIV), *Mycoplasma hyopneumoniae*, Circovirus porcino tipo 2 (PCV2) y virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV). Para ello, las proteínas más inmunogénicas de cada patógeno se expresaron en distintos sistemas heterólogos, tales como *Escherichia coli* y/o células de insecto. Estos antígenos recombinantes se emplearon como diana para la obtención de aptámeros y anticuerpos monoclonales y, a continuación, con estos elementos se trabajó en el diseño de nuevos ensayos de diagnóstico. Los aptámeros son moléculas cortas de ADN o ARN que adquieren una estructura tridimensional tal, que les permite reconocer de forma específica a un ligando concreto. En el presente trabajo, se consiguieron expresar los antígenos de interés, así como seleccionar varios aptámeros específicos para cada uno de los antígenos

diana. Así mismo, empleando dichos reactivos, se consiguió optimizar *in vitro* un ensayo tipo ELASA para cada uno de los microorganismos enumerados. Los distintos ensayos ELASA se evaluaron empleando muestras de campo, obteniendo unas sensibilidades comprendidas entre el 40 y el 89 % y unas especificidades comprendidas entre el 73 y el 100 %, observándose los parámetros diagnósticos más prometedores en el caso de la utilización de muestras del tracto respiratorio. Concretamente, con el ensayo ELASA optimizado para detección de antígeno de SIV se obtuvieron unos resultados que permitieron desarrollar el prototipo como un producto comercial.

Seguidamente, se obtuvieron anticuerpos monoclonales para el desarrollo de ensayos de diagnóstico, tanto directos como indirectos, para la detección de la infección por el virus de la peste porcina africana (ASFV). ASFV es un patógeno complejo, formado por más de 150 proteínas, cuya presencia en una zona geográfica concreta, tiene unas enormes implicaciones económicas para la industria. Por este motivo, la puesta a punto de nuevos y complementarios métodos diagnósticos basados en distintos antígenos del virus tiene un enorme interés para el control y seguimiento de la infección. Empleando un nuevo antígeno recombinante, la proteína VP30, obtenido en el sistema de expresión de *Escherichia coli*, se obtuvieron tres líneas celulares de hibridoma productoras de anticuerpos monoclonales específicos: 11G9, 13A12 y 13E12. Los tres anticuerpos monoclonales purificados mostraron ser potentes herramientas para el desarrollo de métodos de diagnóstico directo, pues mostraron su funcionalidad en ensayos de tipo *western blot*, inmunofluorescencia y DAS-ELISA. Sin embargo, no pudieron aplicarse al diagnóstico indirecto en ensayos de competición.

Finalmente, el diagnóstico simultáneo de varias patologías puede solventar la mayor limitación del diagnóstico de laboratorio, la necesidad de una sospecha clínica, y suponer una gran ventaja en términos de rapidez, abaratamiento, capacidades de cribado de elevados números de muestras y facilidad para la aplicación de campañas de vigilancia. Sin embargo, hasta la fecha se dispone de muy pocos ensayos múltiples comerciales dentro del área de la salud animal. Por ello, en el presente proyecto se ha trabajado en la puesta a punto de métodos de diagnóstico múltiple, empleando microarrays en suspensión para la detección de anticuerpos específicos frente a algunos de los patógenos de mayor interés epidemiológico dentro de la industria porcina. En primer lugar, se desarrolló un panel triple para el diagnóstico diferencial de ASFV y CSFV, dos patógenos de gran impacto para la industria que muestran unos signos clínicos de difícil distinción. El

ensayo triple exhibió unos parámetros diagnósticos excelentes para ambos patógenos (Sn. 95,7 % – 97,3 % y Sp. 98,3 – 99,8 %). Seguidamente, el panel se amplió incorporando cuatro nuevos patógenos de interés: *Mycobacterium bovis*, SIV, PRRSV y HEV. El panel séxtuple desarrollado mostró ser una potente herramienta para la aplicación de campañas de vigilancia epidemiológica, exhibiendo unos buenos parámetros diagnósticos: Sn. 87,2 % – 97,5 % y Sp. 91,6 % – 100 %.

El diagnóstico de laboratorio es clave para la identificación precisa del agente causal de una enfermedad infecciosa, por ello, en el presente proyecto se ha trabajado en la ampliación de las herramientas disponibles dentro del sector veterinario, incorporando además plataformas innovadoras como son el uso de aptámeros y los ensayos múltiples. En primer lugar, se ha evidenciado el potencial de los aptámeros como moléculas captadoras en el desarrollo de ensayos de detección de antígeno, presentando múltiples ventajas en términos de tiempo, coste y reproducibilidad. Se han obtenido nuevos anticuerpos monoclonales específicos frente a la proteína VP30, un antígeno clave en la detección de ASFV. Y se ha conseguido validar un panel séxtuple empleando la novedosa plataforma de microarrays en suspensión para la detección simultánea y diferencial de anticuerpos frente a seis patógenos de interés epidemiológico en ganado porcino.



# Abstract

Swine industry is the source of a third of total animal protein consumed worldwide, and it supports completely or partially the livelihood of millions of people in the world, making it a key sector for world economy. Therefore, the need to guarantee the sustainability of this industry, as well as food safety and animal wellbeing become evident, for which, a pivotal point lies in the control of infectious diseases and their causative agents. During last decades, expansion and structural changes undergone by swine industry led to a marked increase in pathogens' spread and, consequently, to an increase in their impact to the industry. To minimize this impact, the best strategy is prevention through acute diagnostic tools, which allow the tracing of pathogen evolution and to apply an early response against outbreaks, combined with the biosecurity in the farms and the use of vaccines.

Within this context, the main aim of this work has been to enlarge the accessible direct and indirect diagnostic tools and to complement gaps identified in the diagnosis of infectious diseases affecting swine.

First of all, we developed novel direct diagnostic methods (antigen detection) for some of the most relevant pathogens affecting swine industry, as is the Porcine Rotavirus type A (PRVA), a digestive pathogen, and the main pathogens causing primary infections in the Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC): Swine Influenza Virus (SIV), *Mycoplasma hyopneumoniae*, Porcine Circovirus type 2 (PCV2), and Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV). For that purpose, most immunogenic protein of each pathogen was expressed using the heterologous systems of *Escherichia coli* and/or insect cells. These antigens were further used as template to obtain aptamers and monoclonal antibodies, and, next, using these elements we worked in the design of new diagnostic assays. Aptamers are short DNA or RNA molecules which can acquire a three-dimensional structure that allows them to specifically interact with a given ligand. In the present work, we successfully obtained the recombinant antigens of interest as well as several specific aptamers for each of the target antigens. Employing these new reagents, we optimised *in vitro* one Enzyme-Lynked AptaSorbet Assay (ELASA) for each of the pathogens numbered before. Each ELASA was evaluated with field samples, obtaining sensitivities ranging between 40 and 89 % and specificities

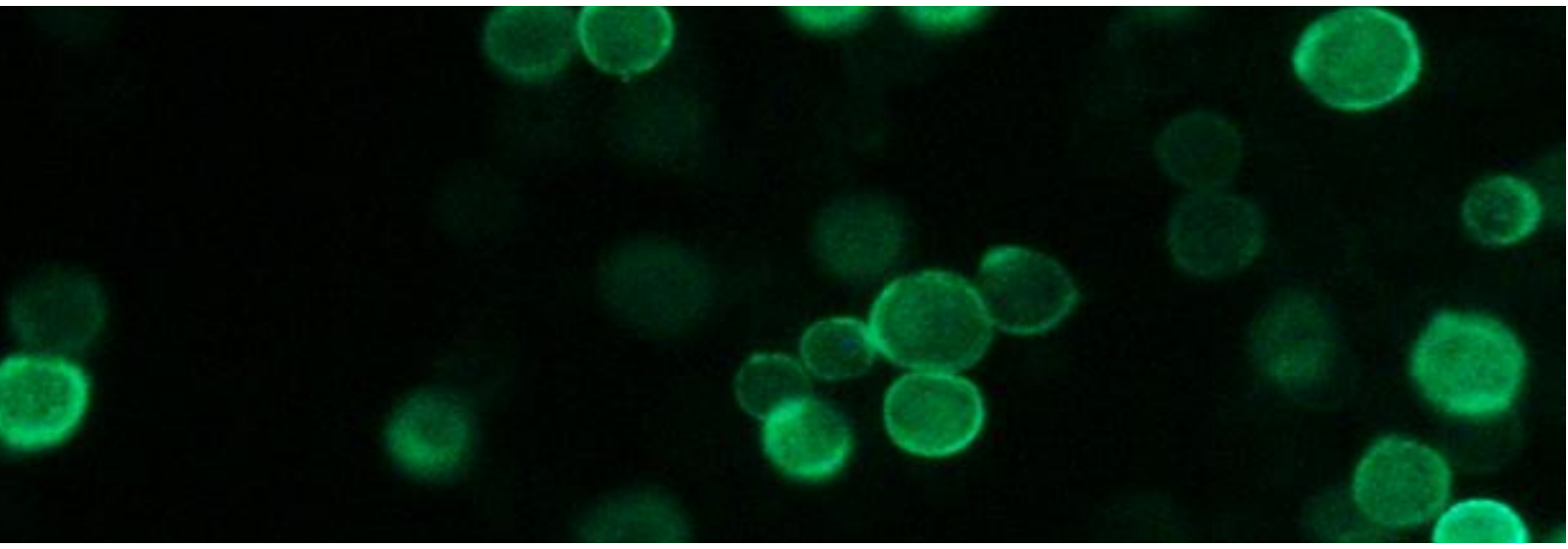
ranging between 73 and 100 %, obtaining more promising diagnostic parameters when using respiratory tract samples. Specifically the ELASA developed for the detection of SIV antigen exhibited results that allowed the development of this prototype as a commercial product.

Next, we obtained monoclonal antibodies for the development of new diagnostic methods, both direct and indirect methods, for the detection of African swine fever virus (ASFV) infection. ASFV is a complex virus composed by more than 150 proteins, whose presence in a given geographic region has huge economic implications for the industry. For this reason, the optimisation of novel and complementary diagnostic methods based on different viral antigens has an enormous interest for the proper control and surveillance of infection. Employing a new recombinant antigen, the VP30 protein, obtained in the heterologous system of *Escherichia coli*, three cellular lines of hybridomas producing specific monoclonal antibodies to the target antigen were obtained: 11G9, 13A12, and 13E12. The three purified immunoglobulins showed to be great tools for the development of direct diagnostic methods, since they all showed their functionality in the following assay formats: *western blot*, immunofluorescence and DAS-ELISA. However, they couldn't be applied to indirect diagnosis in competition assays.

Finally, the simultaneous diagnosis of several pathologies may solve the biggest limitation of the laboratory diagnosis, the need to have a clinic suspicion, and they are a great advantage in terms of speed, price, high throughput screening and ease to design surveillance campaigns. However, to the date, very few multiplex commercial assays are available in vet. For this reason, we developed multiple diagnosis methods using suspension microarrays, for the detection of specific antibodies to some of the pathogens with the greatest epidemiological interest within the swine industry. First, we developed a triplex assay for the differential diagnosis of ASFV and CSFV, two OIE listed pathogens which show clinical signs which are difficult to differentiate. The triplex assay developed, exhibited excellent diagnostic parameters for both pathogens (Sn. 95.7 – 97.3 % and Sp. 98.3 – 99.8 %). Next, the diagnostic panel was increased by the incorporation of four new pathogens of interest: *Mycobacterium bovis*, SIV, PRRSV, and HEV. The sextuplex panel developed showed to be a powerful tool for the implementation of surveillance campaigns in both, pigs and wild boars, exhibiting great diagnostic parameters which ranged from 87.2 % to 97.5 % of sensitivity, with a specificity of 91.6 – 100 %.

Laboratory diagnosis is necessary for the precise identification of the causative agent of an infectious disease, thus, in the present project we have worked in the enlargement of the available tools within the veterinary field, further incorporating innovative platforms such as the usage of aptamers and the multiplex assays. First, we evidenced the potential of aptamers as capturer molecule in the development of antigen detection assays, exhibiting multiple advantages in terms of time, costs, and reproducibility. We have obtained new specific monoclonal antibodies against the VP30 protein, a key antigen in the detection of ASFV. And we have validated a sextuplex panel employing the novel platform of suspension microarrays for the simultaneous and differential detection of antibodies to 6 pathogens of epidemiological interest in swine industry.





# INTRODUCCIÓN

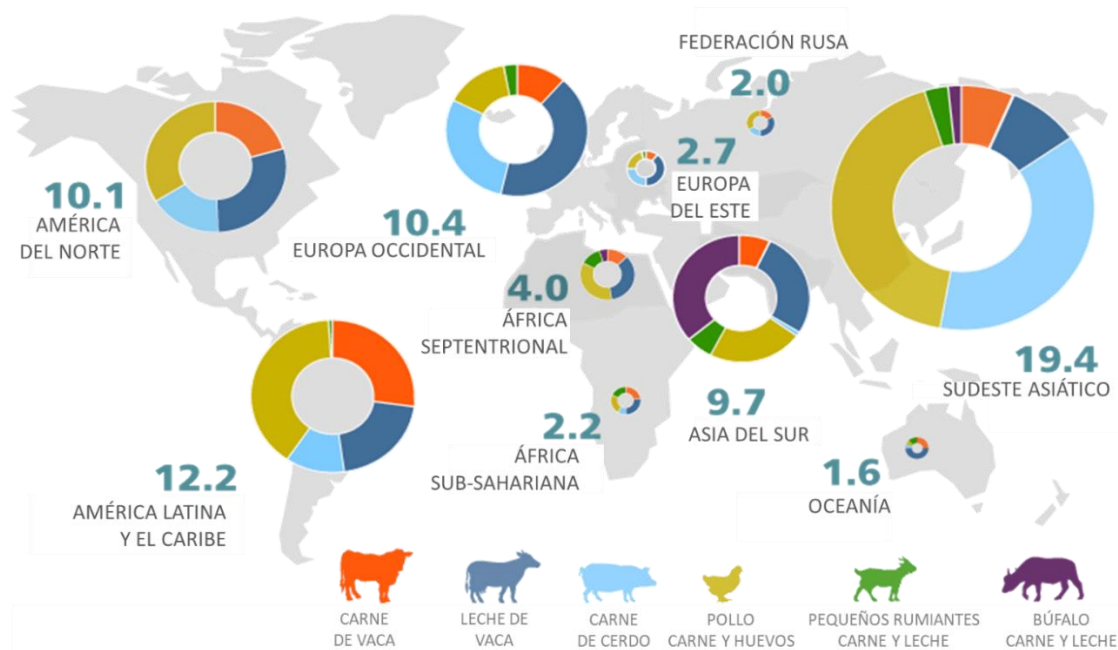


# I. Introducción

## I. 1. Industria porcina

El sector agropecuario es un sector clave en la economía a nivel mundial, contribuyendo a la misma con alrededor de 3 billones de euros, lo que supone cerca del 15 % de la actividad industrial. En los países desarrollados, esta industria supone un 6 % de los ingresos industriales anuales mientras que en aquellos que se encuentran en vías de desarrollo, su importancia es mucho mayor, llegando a suponer más del 70 % de los ingresos industriales anuales en los países más pobres [1]. De acuerdo a datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la producción ganadera contribuye con casi el 40 % de la producción agropecuaria en los países desarrollados y con un 20 % en los países en vías de desarrollo, suponiendo la fuente principal de ingresos de cerca de 1.300 millones de personas [2]. Así mismo, dentro de esta industria, el sector porcino ocupa una posición estratégica, suponiendo el 30 % de la proteína animal consumida mundialmente [3]. La unión europea (UE-28) ocupa el segundo lugar en cuanto a producción mundial de porcino, con un 24,5 % de la producción total de carne, solo por detrás de China que es el mayor productor con alrededor de 54 millones de toneladas producidas anualmente. Así mismo, dentro de Europa, España ocupa la segunda posición en cuanto a producción por detrás de Alemania con un 19 % del total y el primero en cuanto a censo, con más del 21 % del censo comunitario (31,2 millones de animales vivos). Dicho sector, supone el 39 % de la producción final ganadera española, siendo por tanto una de las actividades económicas de mayor relevancia en el país [Figura I.1] [4, 5, 6]. Durante los próximos años se espera que la población mundial continúe creciendo, aunque de una forma mucho menos exponencial que hasta la fecha, y que, por tanto, los requerimientos de todos estos productos se sigan viendo incrementados [7].

## Introducción



**FIGURA I.1 | Producción mundial de proteína animal.** Producción mundial en las distintas regiones de proteína animal en millones de toneladas y perfil porcentual por producto de las mismas. Adaptada de FAO, 2020 [8].

Dada la elevada implicación de la industria porcina en la economía mundial y la continua expansión de la población, desde la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) en colaboración con la FAO se han dado una serie de directrices para garantizar la seguridad alimentaria de los productos derivados de estas industrias, así como de las producciones en cuestión. Un punto clave en esta guía de directrices radica en el control de peligros biológicos dentro de las granjas con medidas de prevención y de actuación frente a posibles brotes, recomendando el control periódico de las instalaciones por veterinarios, la reducción del contacto entre animales sanos y enfermos, la obligatoriedad en la notificación de determinadas enfermedades... [9], para lo cual es indispensable disponer de herramientas de control fiables. En las últimas dos décadas, el aumento de la demanda de carne de cerdo ha hecho que el sector haya sufrido un drástico cambio en la cría y mantenimiento de animales. En líneas generales, se ha experimentado una reducción en el número de granjas con un gran incremento en la densidad de animales en cada una de ellas a nivel mundial, lo que ha facilitado la expansión de enfermedades infecciosas dentro de las mismas [10]. Así mismo, la intensificación y globalización de los mercados han favorecido la expansión de los agentes patógenos por todo el mundo

debido al movimiento de animales, alimentos o productos derivados de estas industrias [11].

Así, el objetivo principal del presente trabajo de tesis doctoral es el diseño e implementación de nuevas plataformas de diagnóstico individual y múltiple que faciliten el control de la expansión de esos agentes infecciosos en la industria porcina.

## **I. 2. Enfermedades infecciosas y respuesta inmune**

Desde el descubrimiento de los “animálculos” por Antoni van Leeuwenhoek en los años 1670s y la posterior demostración por Robert Koch, Louis Pasteur y sus contemporáneos a mitad del siglo XIX, de que ciertos microorganismos eran los causantes de enfermedades, se han hecho enormes esfuerzos por entender el ciclo biológico, la transmisión y las características principales de estos patógenos en todos los campos de salud (humana, vegetal, veterinaria...), así como por desarrollar estrategias para prevenir, diagnosticar y tratar esas enfermedades. A pesar de los continuos éxitos obtenidos en este campo, con la erradicación de diversas enfermedades en muchos países, las enfermedades infecciosas siguen teniendo un altísimo impacto a todos los niveles [12]. Concretamente, en la industria ganadera, las enfermedades infecciosas son responsables de más del 20 % de las pérdidas económicas a través de distintos factores relacionados directamente con la aparición de los nuevos brotes como son: el aumento de la mortalidad, la pérdida de productividad o los gastos veterinarios, y costes indirectos tales como las restricciones en el comercio, en la movilidad de los productos, la reducción del valor de mercado y las investigaciones epidemiológicas derivadas, e, incluso, su posible impacto para la salud humana (inseguridad alimentaria y aparición de nuevas enfermedades zoonóticas) [11, 13]. A modo de ejemplo, cabe destacar el problema surgido en los últimos años en China por la introducción del virus de la peste porcina africana (ASFV) que, según datos de la FAO, supuso en 2018 una reducción del 4 % en la producción mundial de porcino y, más concretamente, de un 10 % en la producción de porcino en China [3].

Las enfermedades infecciosas se producen cuando un microorganismo potencialmente patógeno supera las barreras de protección de los organismos superiores (piel y mucosas), y da paso a un daño de los tejidos o a alteraciones funcionales de las

## **Introducción**

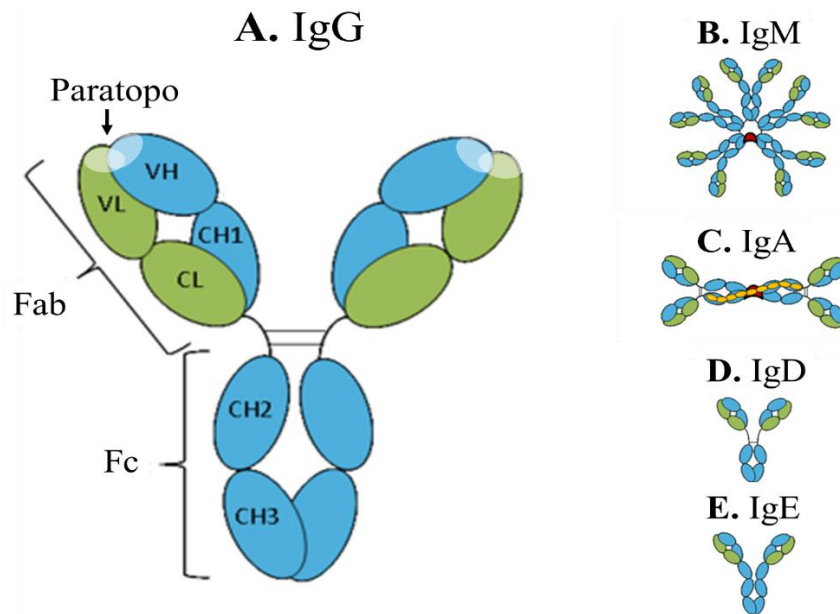
células. En consecuencia, el organismo afectado desarrolla una respuesta celular de protección denominada respuesta inmune, que se inicia con el reconocimiento del patógeno como un elemento ajeno, seguida de una cascada de reacciones para eliminarlo. Se diferencian dos tipos de respuesta inmune: la respuesta innata y la respuesta adaptativa. La **respuesta innata** es una respuesta general e inespecífica iniciada inmediatamente después de la entrada del microorganismo, a través del reconocimiento de patrones moleculares asociados a los patógenos (PAMPs). Estos motivos son generales y se encuentran en la mayoría de los microorganismos potencialmente patógenos [14]. Es una respuesta que no se altera con las sucesivas infecciones y cuyos fines son: 1) eliminar a los patógenos del medio activando a las células fagocíticas (macrófagos y neutrófilos) y mediante la liberación de proteínas bactericidas como el sistema del complemento y la lisozima, y 2) atraer a las células del sistema inmune a la zona de lesión (respuesta inflamatoria) [15, 16].

Por otro lado, la **respuesta adaptativa** es exclusiva de vertebrados, específica para un patógeno concreto y tarda más en producirse (4-5 días) ya que implica la activación de las células T y B del sistema inmune. Esta respuesta se genera frente a estructuras concretas que se conocen como antígenos (del inglés *antibody generator*) y pueden ser de cualquier naturaleza química (proteínas, carbohidratos, lípidos...). Generalmente es una pequeña parte de este antígeno la que es capaz de inducir una respuesta inmune y a esta región concreta se le denomina epítipo. Un antígeno puede contener en su estructura diversos epítipos. Al reconocer esos epítipos concretos a través de sus receptores de membrana, los linfocitos T y B inician un proceso de proliferación y diferenciación, aumentando el número de células maduras capaces de reconocer a ese patógeno concreto. Los linfocitos B maduros son las células encargadas de combatir a los patógenos extracelulares y sus productos mediante la secreción de anticuerpos, proteínas conocidas como inmunoglobulinas, que son capaces de reconocer y unir de forma específica a los antígenos. Como resultado se produce la opsonización del patógeno, un marcaje del mismo que favorece su eliminación mediante las células fagocíticas. Por otro lado, los linfocitos T reconocen a través de sus receptores a los epítipos procesados presentados junto al complejo mayor de histocompatibilidad, en la superficie de las células presentadoras de antígenos. De esta forma se activan y producen moléculas solubles (citoquinas) que favorecen la eliminación del patógeno. A largo plazo, este aumento en la proliferación de células específicas para un epítipo concreto, se traduce en una

memoria inmunológica que hace que, en una segunda exposición al patógeno, el sistema esté preparado y actúe mucho más rápido [15, 16].

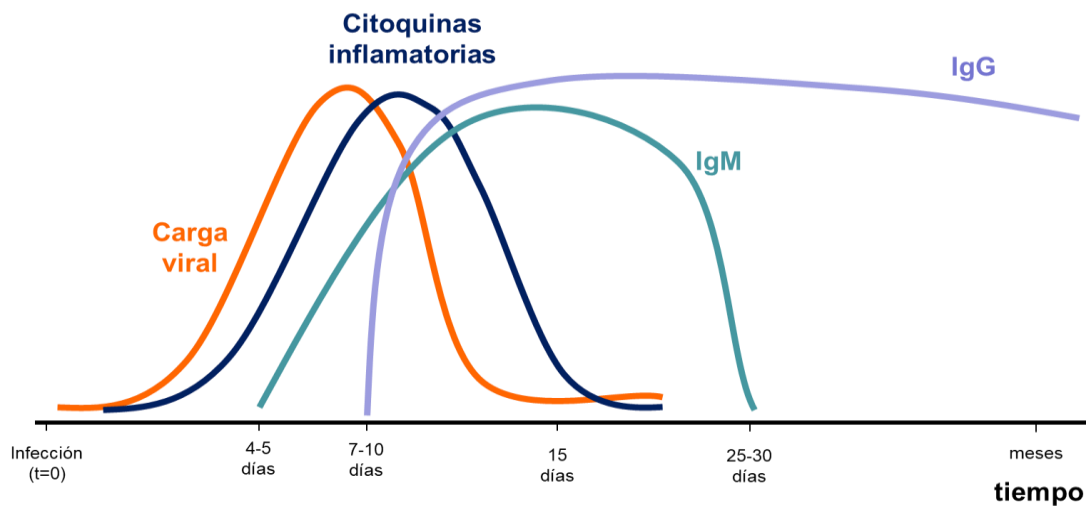
La **inmunoglobulina** (Ig) es una proteína heterodimérica formada por dos cadenas ligeras y dos pesadas unidas entre sí de forma covalente mediante puentes disulfuro. Dichas cadenas están constituidas por un número variable de dominios constantes y un dominio variable encargado de interactuar con el antígeno. En esta molécula se pueden definir dos regiones funcionales distintas, la región Fc cuya función es la señalización dentro del organismo y la región Fab que es la encargada de reconocer al patógeno a través de sus dominios variables. En concreto, igual que sucede en el antígeno, es una región específica de los dominios variables de la Ig la que interacciona directamente con el patógeno, y que recibe el nombre de paratopo. Ante la entrada en el organismo de un patógeno se generan distintos tipos de inmunoglobulinas con diferentes implicaciones en la respuesta inmune [17] entre las que cabe destacar dos tipos: IgG e IgM. Las IgG suponen entre el 70-75 % de las inmunoglobulinas presentes en el suero de un individuo sano y se dividen a su vez en 4 subclases: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 que difieren ligeramente entre ellas por la secuencia de su cadena pesada. Son las principales opsoninas del sistema inmune. Las IgM se expresan en los primeros momentos de maduración de los linfocitos B y son moléculas con escasa especificidad debido a su inmadurez, pero con una elevada avidéz debido a su naturaleza multimérica. Generalmente, la presencia de estas moléculas se asocia con una respuesta inmune primaria y se emplea para diagnosticar una exposición reciente al patógeno. Suponen alrededor del 10 % del total de las inmunoglobulinas presentes en suero. Así mismo, existen otros tres tipos de inmunoglobulinas menos representativas en suero: IgA, presente principalmente en secreciones de mucosas, IgE, implicada en reacciones inmunes a parásitos y en respuestas alérgicas, e IgD, cuya función está menos descrita y que aparecen principalmente asociadas a la superficie celular de linfocitos B [Figura I.2][16].

## Introducción



**FIGURA I.2 | Esquema de la estructura bidimensional de las distintas inmunoglobulinas. A.** Estructura típica de una inmunoglobulina (IgG) en la que se indican los dominios globulares constantes (C) y variables (V) de la cadena pesada (H, azul) y ligera (L, verde), la región del paratopo y las regiones funcionales Fab y Fc. **B.** Estructura de la IgM secretada. **C.** Estructura de la IgA secretada. **D.** Estructura de la IgD. **E.** Estructura de la IgE, mayoritariamente anclada a membranas. Adaptada de Absolute Antibody, 2020 [18].

Conociendo el funcionamiento del sistema inmune y las diferencias principales entre los distintos tipos de Ig, el estudio de la respuesta inmune generada tras una infección puede ser de gran ayuda para determinar el estadio de dicha infección. En los primeros momentos de la infección, el aumento en los niveles del patógeno en el organismo potenciará la respuesta innata, observándose un aumento en los niveles de citoquinas inflamatorias. A continuación, se producirá la activación de la respuesta adaptativa que se inicia a los 4-5 días tras el contacto con el patógeno con un aumento en los niveles de IgM específicas. Seguidamente, la maduración de los linfocitos B activados hará que se produzca un cambio en el tipo de Ig circulantes, reduciéndose los niveles de IgM en paralelo al aumento de los niveles de IgG (seroconversión), las opsoninas más eficientes para combatir la infección. Los niveles de IgG en suero son, generalmente, más prolongados en el tiempo que los de IgM pudiendo mantenerse incluso durante años y suponen la evidencia del desarrollo de una memoria inmunológica [Figura I.3]. Aunque este esquema general puede variar según la patología [15, 16].



**FIGURA I.3** | Variación cualitativa de carga viral, citoquinas e inmunoglobulinas IgG e IgM tras la entrada de un patógeno en el organismo.

Para evitar el impacto generalizado de estas enfermedades infecciosas en las diversas áreas de la salud y, concretamente, en la industria porcina, la mejor estrategia es la vigilancia y prevención. Desde los trabajos pioneros de John Snow usando registros médicos y estudios espaciotemporales para identificar la transmisión por agua del cólera [19], la epidemiología se erigió como la candidata para llevar a cabo esta aproximación. Actualmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) define la epidemiología como “el estudio de la distribución y los determinantes de eventos relacionados con el estado de salud de una determinada población” [20].

Generalmente, las enfermedades infecciosas están causadas por un único agente etiológico y el reto para la epidemiología no es solo identificar a este agente, sino determinar los factores más próximos (y en algunos casos distales) que producen la infección [21]. La epidemiología de enfermedades infecciosas tiene que evaluar distintos términos descriptivos y cualitativos como son; 1) aparición de la enfermedad y distribución en lugar y tiempo, 2) reservorios de los agentes infecciosos, 3) modos y rutas de transmisión, 4) factores biológicos relacionados con el patógeno e influencia en la transmisión de los mismos, 5) factores biológicos relacionados con el hospedador, 6) factores ambientales e influencia en la transmisión, y 7) relación de nuevos cuadros clínicos con un patógeno ya descrito o nuevo [22]. La determinación de todos estos parámetros sobre una enfermedad infecciosa concreta permite actuar en los principales puntos de transmisión y programar la mejor actuación ante futuros brotes.

## *Introducción*

Los estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto que la transmisión de microorganismos patógenos surge en muchas ocasiones de los contactos entre humanos, animales y el medio ambiente. En concreto, alrededor de un 60 % de los agentes infecciosos emergentes que afectan al hombre provienen de animales (zoonosis) y, de éstos, el 75 % tiene su origen en animales salvajes. Los esfuerzos para combatir estos problemas que se llevan a cabo desde un único sector no son suficientes, y en este contexto surgió el concepto “**Una Salud**” (*One Health*). El término “Una Salud” es una aproximación colaborativa al desarrollo e implementación de una serie de programas, políticas e investigaciones abordadas desde un punto de vista interdisciplinar. En ellas se consideran todos los factores, tanto de salud humana como veterinaria (animales domésticos y salvajes), vegetal y medioambiental, que inducen o aumentan el riesgo de aparición de una enfermedad [23-27]. Desde mediados de los años 2000s, este campo multidisciplinar se ha ido expandiendo y ha mostrado su utilidad, siendo especialmente evidente en el control de enfermedades zoonóticas, y poniendo en evidencia los efectos sinérgicos del trabajo interdisciplinar. Uno de los principales objetivos del movimiento “Una Salud” es la integración de los programas de vigilancia epidemiológica humana y veterinaria, así como de los métodos de detección temprana en poblaciones humanas y animales para facilitar la identificación de patógenos y su circulación. Un claro ejemplo a este respecto fue el brote producido por el virus del Nilo Occidental en Nueva York en 1999, que generó un brote de encefalitis en personas mayores, al tiempo que se observaban grandes aumentos en la mortalidad de aves. De haber tenido una estrecha colaboración en los procesos diagnósticos humanos y veterinarios, la etiología del agente se habría identificado mucho antes, limitando su impacto en la salud humana [25]. Desde 2015, la organización mundial de las Naciones Unidas (ONU) está potenciando las ideas recogidas en el concepto “Una Salud” con el desarrollo de la agenda 2030 para el desarrollo sostenible y los 17 objetivos específicos planteados, que buscan acabar con la pobreza, proteger el planeta y mejorar la vida de las personas actuando de forma colaborativa desde todas las áreas de desarrollo [28].

Las herramientas diagnósticas modernas proporcionan los medios para llevar a cabo estos programas de vigilancia de microorganismos patógenos de forma conjunta y, de esta manera, ayudar a predecir y controlar su paso entre especies [25].

### I. 3. Diagnóstico de enfermedades infecciosas

La mejor estrategia para llevar a cabo un diagnóstico preciso y determinante de las enfermedades infecciosas es la combinación del diagnóstico basado en signos clínicos y los resultados del análisis de laboratorio. La labor de los profesionales dedicados al diagnóstico de enfermedades infecciosas es responder a tres preguntas: (1) ¿está la enfermedad causada por un microorganismo?; (2) si es así, ¿por cuál?; (3) ¿cuál es la mejor terapia que aplicar en cada caso? [29], que son cruciales para identificar la causa de una enfermedad a ambos niveles: individual, para asistir a los profesionales clínicos en el tratamiento; y poblacional, para llevar a cabo programas de contención que eviten futuras expansiones [30].

Los resultados proporcionados por los análisis de laboratorio deben ser apropiados, significativos y relevantes a nivel clínico, y deben ser evaluados por profesionales. Para obtener un diagnóstico fiable es necesario seguir una serie de pautas.

- **Selección de las muestras.** Las muestras para el análisis deben ser seleccionadas, recogidas y mantenidas en unas condiciones óptimas para que tanto el análisis como la interpretación de los resultados respondan a las necesidades del diagnóstico. Así mismo, tras la toma de muestras, éstas deben llegar al laboratorio tan rápido como sea posible y el tipo de procesamiento debe adecuarse a los procesos patológicos de los microorganismos a detectar [29, 31].

- **Selección de la prueba.** Para seleccionar la mejor aproximación al diagnóstico hay que considerar distintos parámetros, como son la adecuación de las características de la prueba (sensibilidad y especificidad principalmente) al escenario planteado, la aplicabilidad de los resultados obtenidos y si el resultado estará a tiempo para tener consecuencias sobre el tratamiento. Así mismo, la capacidad técnica del laboratorio para llevarlo a cabo y el coste-beneficio son otros criterios que se aplican de forma habitual en el diagnóstico. Esta tarea puede complicarse más aún cuando no se dispone de un ensayo de referencia o *gold-standard* frente al que seleccionar el mejor método [30].

La técnica general de referencia para identificar un agente patológico es en muchos casos el aislamiento del microorganismo y su caracterización mediante métodos bioquímicos o inmunológicos [32]. Estas estrategias no necesitan una hipótesis diagnóstica previa y permiten, sobre todo en el caso de bacterias y hongos, determinar el

## *Introducción*

mejor tratamiento a aplicar. Sin embargo, son métodos lentos que retrasan el diagnóstico entre dos días y más de una semana, demorándose más aún en caso de tener que determinar el tratamiento adecuado. Las técnicas de aislamiento solo son capaces de detectar microorganismos cultivables, lo que hace que muchos patógenos no puedan diagnosticarse por esta vía; y en función del nivel de bioseguridad del patógeno a detectar, pueden requerir de unas infraestructuras y materiales que las convierten en técnicas caras y de difícil aplicación [33].

Durante las últimas décadas han surgido otras alternativas a estos métodos diagnósticos basados en el cultivo y aislamiento de patógenos. Estas alternativas permiten la detección de la infección mediante dos aproximaciones:

- **Diagnóstico directo** de la patología, mediante la identificación del patógeno en muestras biológicas, a través de la detección de su material genético o de alguna de sus proteínas.
- **Diagnóstico indirecto** mediante el análisis de la respuesta inmune generada en el individuo frente al patógeno en cuestión, generalmente a través de ensayos serológicos en los que se detectan, y en ocasiones cuantifican, los niveles de anticuerpos específicos generados.

Este tipo de ensayos diagnósticos presentan varias ventajas, como son: reducción de los tiempos para obtener el resultado, bajo coste, capacidad de automatización, sensibilidad y especificidad. Sin embargo, es necesario hacer una escrupulosa evaluación clínica previa para implementar el método diagnóstico apropiado, focalizado en los patógenos que más probablemente sean los reponsables de la enfermedad observada.

La técnica por excelencia para el diagnóstico directo actualmente es la reacción en cadena de la polimerasa (**PCR**), que desde su invención, se erigió como una técnica sensible, específica, rápida y robusta, además de mostrar una buena predisposición a la automatización [34, 35]. Dado que todas las especies tienen regiones de secuencia genética única, es posible diseñar secuencias cortas de ADN (oligonucleótidos) complementarias a una de dichas regiones, amplificarlas mediante PCR y determinar la presencia o ausencia del material genético de estos patógenos en una muestra [36]. Además, la versatilidad de esta tecnología, ha hecho que durante los años haya experimentado un proceso de evolución continuo con la introducción constante de innovaciones que han ido refinando la técnica y ampliando sus áreas de implementación

[37]. Las más importantes se describen brevemente a continuación: **(1) la retrotranscripción (RT-PCR)** que, con el descubrimiento de las retrotranscriptasas (síntesis de ADN empleando moléculas de ARN como molde) permitió la amplificación de secuencias de ARN, abriendo la tecnología a cualquier tipo de patógeno. **(2) La PCR a tiempo real** o PCR cuantitativa (qPCR) abrió la posibilidad de monitorizar la amplificación de producto convirtiendo a la PCR en una técnica cuantitativa a través de la determinación del ciclo en el que la señal de la molécula detectora comenzó a aumentar por encima de la señal umbral (Ct, ciclo umbral). Y, por último, más recientemente, la tecnología se ha actualizado con distintas estrategias de **(3) amplificación isotérmica** de las regiones de interés [38-41].

En paralelo al desarrollo de los ensayos tipo PCR surgieron otras alternativas al diagnóstico de laboratorio: los **inmunoensayos**. Estos ensayos son métodos de detección basados en la idea original de Yalow y Berson que, en 1960, describieron la primera técnica que empleaba anticuerpos ligados a una señal radioactiva para la detección de analitos [42]. Al basarse en una reacción específica antígeno-anticuerpo, los inmunoensayos permiten la detección tanto de proteínas del patógeno de interés que actúan como antígenos (diagnóstico directo), como de los anticuerpos generados en el organismo en respuesta a la infección (diagnóstico indirecto) con elevada especificidad y sensibilidad.

Para poder desarrollar este tipo de ensayos inmunológicos, el primer paso es obtener los reactivos necesarios para ponerlos a punto, es decir, proteínas del patógeno y moléculas detectoras como los anticuerpos. Estos procesos de obtención pueden ser costosos y en algunos casos, los reactivos tienen que ser mantenidos en unas condiciones controladas de temperatura y humedad, por lo que la optimización de estos reactivos es un paso clave para desarrollar de forma exitosa un inmunoensayo [43].

### I. 4. Obtención de herramientas moleculares para el desarrollo de ensayos diagnósticos

Los primeros inmunoensayos desarrollados, empleaban los patógenos completos o semi-purificados tanto para la optimización de ensayos diagnósticos indirectos, como para la obtención de las moléculas detectoras. En los últimos años, estas tecnologías han ido cayendo en desuso debido a la dificultad de obtener grandes cantidades de patógeno atenuado o inactivado en cultivo celular, al coste de la producción, el riesgo asociado a su manejo, los requerimientos de personal altamente cualificado y la necesidad de disponer en muchos casos de instalaciones con un elevado nivel de bioseguridad para el manejo. Así mismo, algunos patógenos no se producen bien en cultivo celular o, directamente, no pueden ser cultivados con las aproximaciones disponibles, lo que limita enormemente el desarrollo de métodos diagnósticos [44, 45].

#### I. 4. 1 Antígenos recombinantes

Desde su desarrollo en 1973 [46], la tecnología del ADN recombinante ha revolucionado muchos sectores, incluyendo el sector del diagnóstico de enfermedades infecciosas. El clonaje y expresión de los antígenos más relevantes de los patógenos de interés reduce significativamente todos los problemas descritos del manejo del agente patógeno. Los antígenos obtenidos de forma recombinante no son infecciosos, se generan con unos altos rendimientos, los procesos de producción así como los ensayos desarrollados son estandarizables y escalables y se pueden emplear para la obtención de otros reactivos como anticuerpos, ya que se obtienen con mínimas variaciones en su estructura, lo que garantiza el mantenimiento de los epítomos [44, 45]. Actualmente los antígenos recombinantes se emplean en el ámbito de la veterinaria de forma habitual en el desarrollo de ensayos diagnósticos, vacunas y ensayos diagnósticos diferenciales entre animales infectados o vacunados entre otras aplicaciones [47, 48]. Para maximizar la aplicación de la tecnología del ADN recombinante, se han desarrollado diversas estrategias destinadas a facilitar el clonaje de secuencias génicas como son: la recombinación *in vivo*, el diseño de sitios de trasposición y recombinación, la transferencia de hebras por topoisomerasas... Uno de esos sistemas ampliamente utilizado es el sistema Gateway<sup>®</sup>, basado en el clonaje de los productos de PCR en un plásmido de clonaje (pCR8<sup>TM</sup>/GW/TOPO) que presenta a ambos lados del sitio de clonaje

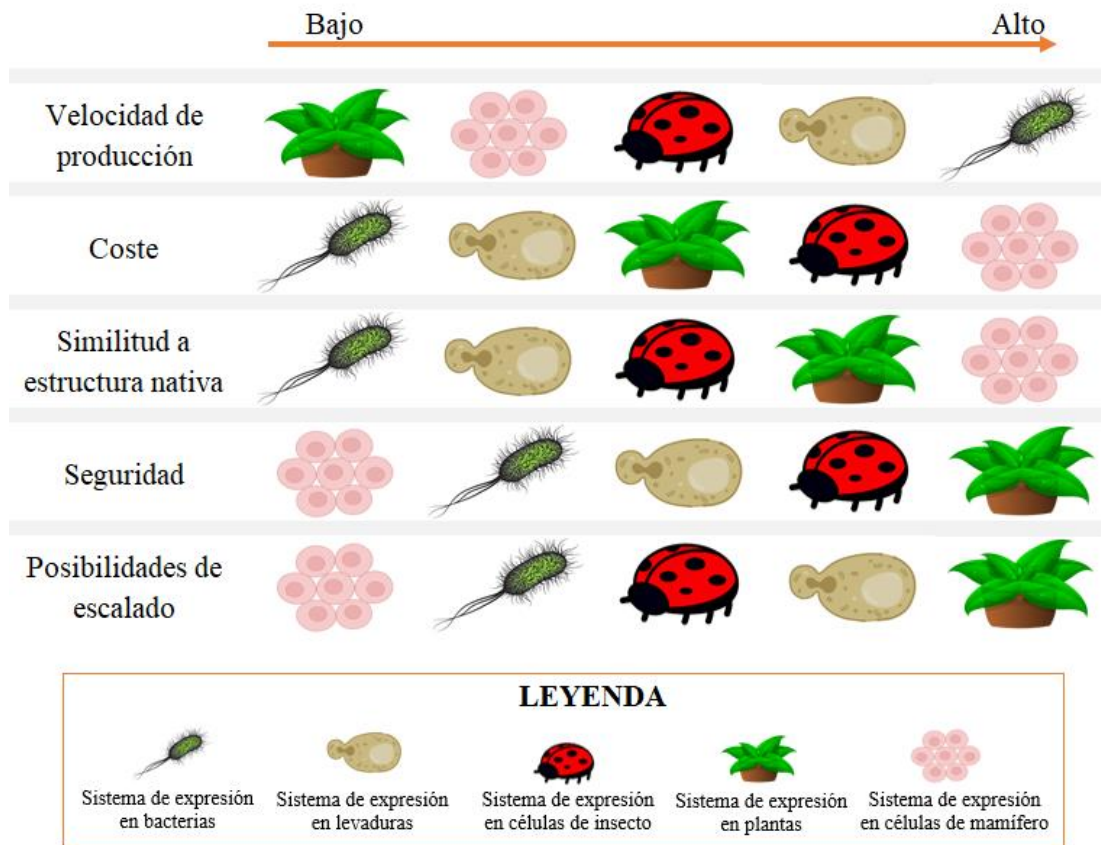
regiones de recombinación que facilitan el subclonaje en diversos vectores de expresión mediante una reacción de recombinación *in vitro* [49].

Actualmente hay una amplia variedad de sistemas para la expresión de proteínas recombinantes, entre los que destacan los sistemas heterólogos de bacterias, levaduras, células de insecto, plantas transgénicas y células de mamífero. Seleccionar el mejor sistema para la obtención de un antígeno funcional implica la valoración de muchos factores: (1) seleccionar el sistema que permita un buen plegado y procesamiento de la proteína, (2) seleccionar el vector con un agente de selección y un promotor apropiado para la expresión de la proteína en el sistema seleccionado, (3) optimizar la secuencia del gen al uso de codones del sistema de expresión, (4) seleccionar en los casos en que sea necesario un péptido de fusión, (5) seleccionar los péptidos señales para la expresión extracelular, (6) prevenir la degradación proteolítica del producto, (7) diseñar el método de fermentación y (8) optimizar los parámetros del proceso como son la temperatura, pH, transferencia de oxígeno... [50].

El sistema de expresión en **bacterias** es uno de los métodos más empleados en la industria debido a la gran cantidad de ventajas que presenta, como son la velocidad de crecimiento, la facilidad de manipulación genética y el abaratamiento de los productos producidos. Sin embargo, las modificaciones post-traduccionales que incorporan las bacterias son muy limitadas o inexistentes y en la mayoría de los casos las proteínas se producen de forma insoluble y su plegamiento no es el correcto [51, 52]. Las **levaduras** combinan características propias de las células procariotas, como son la velocidad de crecimiento, facilidad en la manipulación genética y bajo coste, con algunas de las ventajas de organismos superiores: sistemas eficientes de procesado post-traduccionales, presencia de retículo endoplasmático que favorece el correcto plegamiento de las proteínas y sistemas de secreción de proteínas, pero su lejanía evolutiva hace que los patrones de modificación y plegamiento difieran en gran medida de los sistemas presentes en mamífero [53]. Las **células de insecto** son capaces de generar la mayoría de las modificaciones post-traduccionales que ocurren de forma habitual en células de mamífero (plegamiento, glicosilación, oligomerización, formación de puentes di-sulfuro, fosforilación y acilación) dando paso a antígenos cuya estructura se asemeja más a la nativa que las obtenidas en células bacterianas o de levadura, con unos rendimientos

## *Introducción*

superiores a las células de mamífero y de forma menos costosa. Sin embargo, hay que tener en consideración que el patrón de glicosilación no es idéntico al de mamífero, lo que puede afectar a la funcionalidad de la proteína recombinante [54-56]. Durante las pasadas dos décadas, las **plantas** han emergido como una plataforma atractiva para la producción de proteínas recombinantes por ser una plataforma de bajo coste, fácilmente escalable dado que no necesita de la implementación de biorreactores, permiten la expresión dirigida a determinadas estructuras de la planta (frutos, hojas...), lo que facilita la purificación y mejora los rendimientos. Son capaces de introducir modificaciones post-traduccionales muy similares a las encontradas en mamíferos, pero son sistemas de lenta obtención y generalmente tienen un rendimiento menor que los sistemas descritos previamente [57-59]. Para la expresión de proteínas de patógenos que habitualmente emplean la maquinaria de células eucariotas para su ciclo vital, el sistema óptimo para garantizar la correcta funcionalidad de la proteína de interés es el sistema de expresión en células de **mamífero**, pues presenta los sistemas de modificación post-traduccionales, rutas de secreción y procesamiento de péptidos señal y chaperonas que garantizan el apropiado plegamiento [60, 61]. Sin embargo, la aplicación de este sistema es costosa, requiere unas instalaciones apropiadas, genera unos rendimientos de producción bajos y es un proceso lento que presenta muchas dificultades en el escalado a grandes volúmenes [62, 63], lo que ha llevado a que su uso en industria sea más limitado ya que, en muchos casos, no permite obtener cantidades suficientes de antígeno [Figura I.4].



**FIGURA I.4 | Comparativa de los distintos sistemas heterólogos de expresión.** Evaluación de distintos parámetros del proceso de obtención de proteínas recombinantes y de las características de la proteína obtenida.

Estas características han hecho que dentro del área de diagnóstico veterinario, las plataformas que se emplean más habitualmente para la obtención de proteínas recombinantes sean el sistema de expresión en bacterias y el sistema de expresión de células de insecto [47].

- **Sistema de expresión en bacterias**

Dentro de todos los organismos que se han empleado habitualmente para la expresión de proteínas recombinantes en bacterias, *Escherichia coli* ha sido el organismo más utilizado durante las últimas dos décadas, debido a que el genoma de esta bacteria está muy bien caracterizado y se dispone de muchas herramientas para la manipulación genética y la mejora de las proteínas expresadas. Actualmente, muchas empresas comercializan una gran diversidad de plásmidos para la expresión y cepas bacterianas

## ***Introducción***

adaptadas al crecimiento a menores temperaturas, que co-expresan chaperonas, o con capacidad de expresar proteínas recombinantes en distintos compartimentos celulares (citoplasma, membrana interna, periplasma o membrana externa) [64]. Para maximizar la expresión de proteínas recombinantes en estos sistemas, una práctica habitual es el uso de promotores inducibles, de modo que la proteína heteróloga solo se exprese cuando el cultivo haya alcanzado un determinado umbral, minimizando la toxicidad y la sobrecarga metabólica para las células procariontas. Los promotores más habitualmente utilizados son el promotor *lac*, inducible tras la adición de análogos no hidrolizables de la alolactosa al medio como es el isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG); o el promotor *ara*, que presenta una represión mayor que otros promotores, reduciendo la expresión basal y que es inducible tras la adición al medio de cultivo de arabinosa [65, 66].

- **Sistema de expresión en células de insecto**

El sistema de expresión heterólogo en células de insecto se describió por primera vez en 1983 empleando un nucleopoliedrovirus, comúnmente conocidos como baculovirus, en concreto se empleó el *Autographa californica* múltiple nucleopoliedrovirus (AcMNPV) [67]. El genoma de estos baculovirus se modifica incorporando la información genética codificante de la proteína de interés. Habitualmente, los genes se clonan bajo el control del promotor de la poliedrina por ser una proteína no esencial para el ciclo vital del baculovirus y por tener una elevada tasa de transcripción en los momentos más tardíos de la infección, aunque también se dispone de vectores que emplean el promotor de la proteína p10 [68]. Estos baculovirus modificados genéticamente se obtienen mediante una recombinación homóloga *in vivo* entre el genoma de baculovirus linealizado del virus y un plásmido de transferencia previamente producido en *E. coli* y que tiene clonado el gen de interés, que actúa como donador [69]. Para la producción de proteínas recombinantes, los cultivos de células de insecto son infectados con los baculovirus modificados genéticamente. De este modo, los baculovirus toman el control de la maquinaria metabólica de las células e inducen la expresión de la proteína de interés junto con el resto de proteínas virales [70].

La expresión en células de insecto mediante el sistema de baculovirus recombinantes (BVES; de las siglas en inglés *BaculoVirus Expression System*) presenta varias características útiles para la producción de proteínas recombinantes a nivel industrial. Las células de insecto presentan varias ventajas para la expresión de proteínas

recombinantes: **(1)** tienen la capacidad de reconocer la presencia de un péptido señal y procesarlo, por lo que presentan sistemas eficientes de secreción, **(2)** algunas variantes son capaces de crecer en ausencia de suero, facilitando la purificación de las proteínas secretadas, y **(3)** son capaces de crecer en suspensión, alcanzando elevadas densidades celulares y dando paso a procesos fácilmente escalables. Así mismo, los baculovirus recombinantes son estables genéticamente y los inóculos pueden ser amplificados varias veces de forma segura, puesto que los baculovirus solo infectan células de insecto [58, 59]. Sin embargo, es un sistema más costoso que el de bacterias y más lento ya que requiere, en primer lugar, la obtención de un inóculo de baculovirus recombinante estable y, en segundo lugar, porque la velocidad de crecimiento de las células de insecto es menor [60].

La tecnología de baculovirus recombinantes se aplica también de forma habitual para la expresión de proteínas recombinantes en larvas, donde la proteína de interés puede suponer hasta el 50 % de la biomasa total del animal. La producción de proteína recombinante empleando insectos en lugar de biorreactores supone un importante abaratamiento del producto y facilita el proceso de escalado, aunque exige de un mayor procesamiento durante las fases de purificación. Las aproximaciones más ampliamente utilizadas a nivel industrial con este fin son la infección de larvas del gusano de seda (*Bombyx mori*) con los baculovirus específicos de esta especie, BmNPV, o de larvas de *Trichoplusia ni* con AcMNPV [58, 71, 72].

### **I. 4. 2 Moléculas detectoras. Anticuerpos monoclonales y aptámeros**

Los **anticuerpos** se identificaron por primera vez en 1890 por Behring y Kitasato, quienes describieron en sus estudios pioneros sobre la difteria, una sustancia presente en la sangre que presentaba la capacidad de neutralizar la toxina diftérica. Los anticuerpos, como se ha descrito previamente, son proteínas multiméricas secretadas por los linfocitos B y que presentan unas características de elevada afinidad y especificidad por un determinado antígeno, lo que despertó desde el principio el interés de los investigadores. Sin embargo, su uso estuvo muy limitado debido a la corta vida media de los linfocitos B diferenciados que imposibilitaba la obtención de estas moléculas en cultivo celular hasta

## *Introducción*

que en los años 1970s, Köhler y Milstein fusionaron por primera vez un linfocito B murino y una célula de mieloma murina [73]. A estas células híbridas obtenidas de la fusión de un linfocito con una célula de mieloma se les conoce habitualmente como hibridomas y presentan las características combinadas de un linfocito (producción de anticuerpo) y una célula cancerígena (inmortalidad), con lo que permitieron la producción de anticuerpos en el laboratorio. A día de hoy, los anticuerpos no solo presentan un papel crucial en el desarrollo de la respuesta inmune, sino que se han convertido en una herramienta fundamental en los laboratorios mostrando interesantes aplicaciones tanto en investigación básica, como siendo potenciales moléculas terapéuticas y diagnósticas, destacando concretamente el desarrollo de inmunoensayos [74].

Cuando un animal de laboratorio, generalmente ratones, aunque también es habitual trabajar con conejos, ratas u ovejas, es inmunizado, su organismo produce un amplio rango de anticuerpos con la capacidad de reconocer distintos epítomos presentes en las proteínas. Cada anticuerpo específico de epítomo es producido por un único linfocito B, por lo que la respuesta inmune inicial es una respuesta policlonal en la que múltiples inmunoglobulinas con distintos dominios de reconocimiento son secretadas por los distintos clones de linfocitos B activados para neutralizar al antígeno (**anticuerpo policlonal, AcP**). La tecnología de obtención de las líneas celulares de hibridomas permite la producción de un único anticuerpo específico de un epítomo concreto al que habitualmente se conoce como **anticuerpo monoclonal (AcM)**. Mientras que los anticuerpos policlonales son baratos de obtener, capaces de reconocer un mayor número de epítomos y si se obtienen de animales grandes pueden obtenerse en gran escala, presentan una limitación para el desarrollo de inmunoensayos que es la posible variación entre lotes de producción, que hace que se generen resultados poco reproducibles. Por otro lado, los anticuerpos monoclonales se producen a partir de cultivos continuos de hibridomas de forma reproducible e inagotable permitiendo el desarrollo de inmunoensayos estandarizables y seguros, por lo que son, siempre que es posible, los más habitualmente empleados [75, 76].

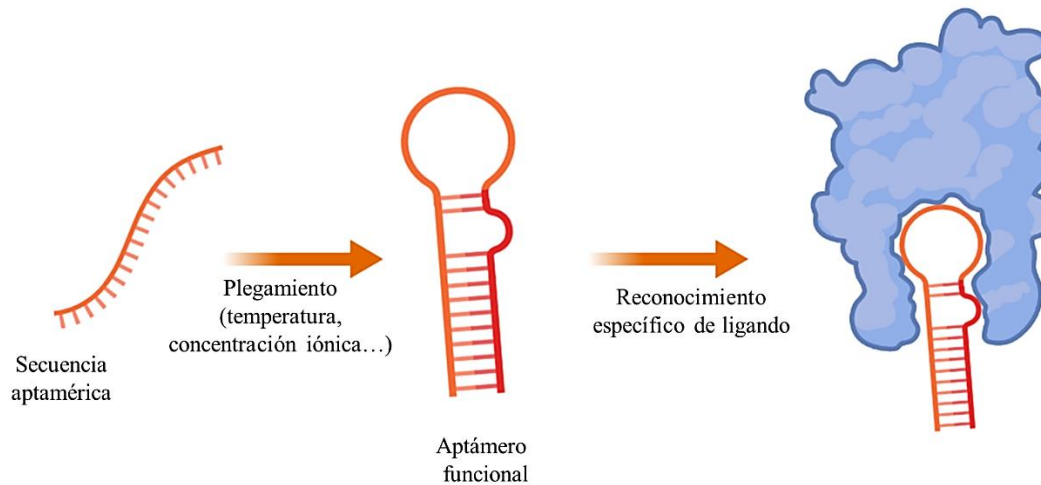
Actualmente, la tecnología de hibridomas sigue siendo la técnica usada de manera preferente para la obtención de anticuerpos monoclonales. El protocolo actual se basa en el descrito por Nowinski *et al.* en 1979 [77] y consiste en la fusión de un linfocito productor de anticuerpos monoclonales específicos por la proteína de interés con una célula de mieloma que proporciona las características de inmortalidad a la línea obtenida.

La selección de los hibridomas se realiza en base a sus características metabólicas diferenciales en un medio de cultivo denominado medio HAT (Hipoxantina-Aminopterina-Timidina) [75, 76].

El proceso de selección de clones de hibridoma es un proceso lento ya que hay que realizar un chequeo continuo de crecimiento y capacidad de producción de anticuerpos, pero una vez que la línea de hibridoma se hace estable puede mantenerse en medio de cultivo indefinidamente. Para solventar las limitaciones de producción y aplicabilidad de los anticuerpos monoclonales, se ha trabajado desde distintas aproximaciones en la obtención de anticuerpos recombinantes, optimización de biorreactores para el cultivo de hibridomas, selección de regiones Fab *in vitro* y humanización de anticuerpos [78-80]. Así mismo, en las últimas décadas han surgido varias alternativas basadas en nuevas moléculas con capacidad de unir antígenos de forma específica empleando tanto proteínas o pequeños péptidos (p.ej. nanocuerpos o afímeros) como ácidos nucleicos (aptámeros) [81].

Los **aptámeros** se describieron por primera vez en 1990 por tres grupos independientes y deben su nombre al término latín *aptus*, adaptación y al término griego *meros*, partícula. Son moléculas sintéticas cortas de ARN o ADN de cadena sencilla (entre 20 y 80 nucleótidos), que adquieren una estructura tridimensional única en unas condiciones físico-químicas determinadas. Esta estructura les permite interactuar con un ligando concreto con elevada afinidad y especificidad, a través de un reconocimiento similar a la reacción antígeno-anticuerpo, a diferencia de otras sondas moleculares, por lo que se consideran anticuerpos sintéticos de naturaleza no proteica. Un aptámero puede reconocer desde macromoléculas como proteínas hasta pequeñas moléculas como nucleótidos, drogas, péptidos e incluso iones metálicos, características que han facilitado la aplicación de esta tecnología a diversos campos tecnológicos como la biomedicina, la farmacia y la clínica [82, 83][Figura I.5].

## Introducción



**FIGURA I.5 | Esquema de la secuencia de reconocimiento de ligando por un aptámero.**  
Creado con [www.BioRender.com](http://www.BioRender.com).

Los aptámeros se generan mediante un proceso *in vitro* de evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (SELEX; de las siglas en inglés *Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*). Este proceso SELEX puede realizarse mediante diferentes estrategias a fin de adaptar los requerimientos a la diana de interés, basándose en todos los casos en ciclos reiterativos de incubación, unión, partición y amplificación por RT-PCR o PCR partiendo de una librería de oligonucleótidos sintéticos de secuencia aleatoria. Así mismo, al obtenerse *in vitro*, presentan ventajas comparados con los anticuerpos: (1) pueden ser seleccionados frente a sustancias tóxicas o no-inmunogénicas manipulando más fácilmente sus afinidades y especificidades, (2) tras su selección se sintetizan de forma química asegurando una pureza y reproducibilidad superior a los anticuerpos de forma más barata, (3) son más fáciles de modificar con distintos grupos funcionales y (4) pueden recuperar su conformación después de una desnaturalización térmica [84, 85].

Todas estas características convierten a los aptámeros en grandes candidatos para la mejora de los inmunoensayos, complementando o reemplazando en ciertos casos el papel que cumplen los anticuerpos en esos desarrollos [86].

Empleando estos reactivos se han desarrollado distintos formatos de inmunoensayos tanto para el diagnóstico directo como indirecto de la infección que se describen detalladamente a continuación.

## **I. 5. Inmunoensayos diagnósticos**

Los inmunoensayos más ampliamente empleados en los laboratorios diagnósticos son los ensayos por inmunoabsorción ligados a enzima (**ELISA**), descritos en 1971 por dos grupos de forma independiente [87, 88]. Esta técnica emplea la reacción antígeno-anticuerpo para inmovilizar un analito sobre el pocillo de una placa de microtitulación. A continuación, se añade una molécula detectora capaz de reconocer al analito por el mismo principio de inmunodetección, que se conjuga a una enzima. Las enzimas más habitualmente empleadas en el marcaje son la fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1) y la peroxidasa (EC 1.11.1.7) que presentan la capacidad de transformar un sustrato cromogénico. De este modo, las ratios de enzima inmovilizada en los pocillos se correlacionan fácilmente con el cambio de color del sustrato y, a su vez, con la cantidad de analito en la muestra. Actualmente, el ELISA es una técnica robusta que permite detectar y cuantificar un analito (antígeno o anticuerpo en diagnóstico) presente en una muestra en pequeñas proporciones, lo que dota a esta tecnología de una gran sensibilidad [89, 90]. Además, al basarse en el reconocimiento antígeno-anticuerpo, presenta una gran especificidad y es una técnica segura y cuantificable.

A lo largo de los años, la tecnología ELISA ha ido evolucionando e incorporando modificaciones tanto en el marcaje de la molécula detectora como en la estructura del ensayo. En función de la estrategia seguida para la inmovilización y detección del analito se han desarrollado distintos formatos de ELISA, entre los que destacan:

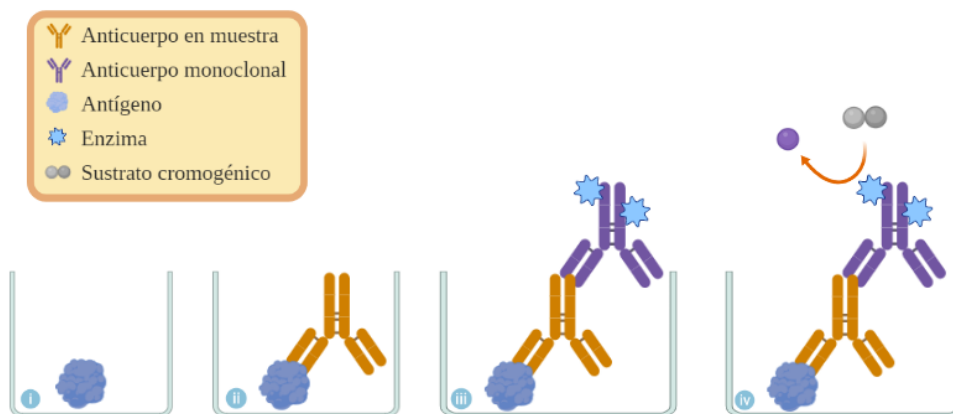
1. ELISA indirecto.
2. ELISA tipo sándwich.
3. ELISA de competición.

Que se describen detalladamente a continuación.

## Introducción

- **ELISA indirecto**

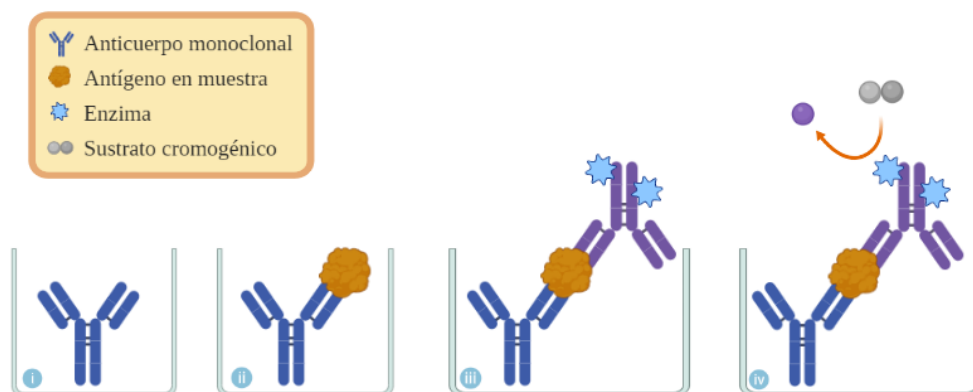
El ELISA indirecto se emplea para **detectar anticuerpos** (diagnóstico indirecto) específicos frente a un patógeno en una muestra que generalmente suele ser de suero, sangre o fluidos orales [Figura I.6]. El ELISA indirecto muestra una elevada sensibilidad y especificidad en el diagnóstico al basarse en la interacción entre un antígeno y un anticuerpo. Es un método rápido, fácil de llevar a cabo y permite detectar anticuerpos frente a todos los epítomos del antígeno. Normalmente, como molécula reveladora del ensayo se utilizan anticuerpos (mono o policlonales) que reconocen de forma específica la región Fc de una especie animal concreta, por lo que el ensayo solo podrá emplearse para dicha especie y reconociendo un tipo específico de Ig. Hay que tener en cuenta que la introducción de una segunda molécula detectora puede inducir reactividades cruzadas en el desarrollo del ensayo [43]. Alternativamente, este segundo anticuerpo puede sustituirse por proteínas con afinidad por las inmunoglobulinas sin distinción entre el tipo de IgG como son la proteína A o la proteína G, que permiten el desarrollo de inmunoensayos independientes de especie.



**FIGURA I.6 | Esquema de un ELISA indirecto.** i. Captura de antígeno en los pocillos de las placas. ii. Inmovilización de anticuerpos contenidos en la muestra mediante el reconocimiento específico de epítomos. iii. Reconocimiento de la región Fc de las Ig por un anticuerpo marcado con una enzima. Alternativamente dicho anticuerpos puede sustituirse por proteína A o proteína G marcada. iv. Adición de un sustrato cromogénico cuyo cambio colorimétrico se relaciona directamente con la presencia de anticuerpos inmovilizados. Creado con [www.BioRender.com](http://www.BioRender.com).

- **ELISA tipo sándwich de doble anticuerpo (*double antibody sandwich ELISA, DAS-ELISA*)**

Este formato de ensayo busca la **detección de antígeno** en la muestra para el diagnóstico directo de la infección. Recibe su nombre de la capacidad de capturar antígeno de la muestra mediante el uso de dos anticuerpos a modo de sándwich [Figura I.7][89]. El DAS-ELISA presenta varias ventajas con respecto a la PCR, generalmente no requiere pasos de purificación o extracción de las muestras previas a la realización del ensayo, no requiere complejos equipos como los termocicladores para llevarse a cabo, requiere un personal menos especializado que para la extracción de material genético y realización de la reacción de amplificación, lo que facilita su aplicación diagnóstica. Sin embargo, su mayor limitación comparada con la PCR a la hora de detectar antígeno es la sensibilidad. Las proteínas no pueden amplificarse como el ADN o ARN a través de reacciones *in vitro*, haciendo que se necesite una mayor carga viral para detectar la infección. Esta técnica requiere del uso de una buena pareja de anticuerpos para la realización del ensayo que reconozcan: bien dos epítomos distintos en el antígeno, o epítomos repetidos. Además, a la hora de optimizar este tipo de ensayos es necesario considerar que la opsonización de las inmunoglobulinas generadas en el animal puede enmascarar algunos de los epítomos más importantes de los patógenos, dificultando su detección [91, 92].



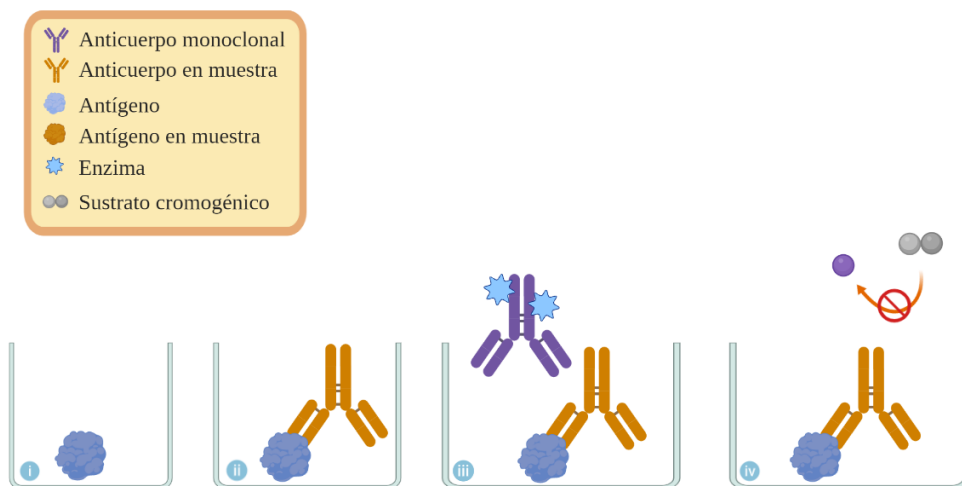
**FIGURA I.7 | Esquema de un DAS-ELISA. i.** Preparación de placas para el ensayo a través de la fijación de anticuerpos específicos. **ii.** Inmovilización del antígeno contenido en la muestra a través del reconocimiento específico del anticuerpo. **iii.** Reconocimiento por un segundo anticuerpo marcado con una enzima, del antígeno capturado en la placa. **iv.** Adición de un sustrato cromogénico cuyo cambio colorimétrico se relaciona directamente con la presencia de antígeno inmovilizado. Creado con [www.BioRender.com](http://www.BioRender.com).

## Introducción

- **ELISA de competición**

Este tipo de ensayo puede usarse para **detección de antígeno o de anticuerpo**, aunque la variante de antígeno tiene una aplicación más limitada en el campo.

En el presente trabajo solo se ha abordado el desarrollo de ensayos ELISA de competición para la detección de anticuerpos. En este caso, en los pocillos de la placa de microtitulación se inmoviliza el antígeno del patógeno de interés [Figura I.8]. El cambio colorimétrico del sustrato será inversamente proporcional a la cantidad de anticuerpos en la muestra. Su mayor limitación es que, al trabajar con un solo anticuerpo de competición, el ensayo limita su sensibilidad a un único epítopo, por lo que la selección del mismo es crucial para el desarrollo del ensayo. Sin embargo, esta limitación supone una ventaja a nivel de especificidad del ensayo, al detectar un único epítopo la posibilidad de reactividad cruzada con otros patógenos se reduce enormemente. Estos ensayos presentan además las ventajas de permitir detectar tanto IgG como IgM indistintamente y poder ser aplicados independientemente de la especie de la que se toma la muestra.



**FIGURA I.8 | Esquema de un ELISA de competición para la detección de anticuerpos.**

**i.** Preparación de placas mediante la inmovilización del agente capturador. **ii.** Adición de la muestra e inmovilización de la molécula a detectar. **iii.** Adición de la molécula marcada con una enzima que se unirá únicamente a las regiones no bloqueadas. **iv.** Adición de un sustrato cromogénico cuyo cambio colorimétrico se relaciona inversamente con la presencia de analito en la muestra. Creado con [www.BioRender.com](http://www.BioRender.com).

La plataforma ELISA es la técnica predominante en los laboratorios diagnósticos y actualmente es la técnica de referencia para muchas enfermedades infecciosas. Sin embargo, suelen tener protocolos de más de una hora de duración, requieren de un personal entrenado y para su realización hacen falta una serie de equipos que imposibilitan su aplicación *in situ*. Para ampliar la implementación de estos inmunoensayos, se inició el desarrollo de ensayos rápidos de aplicación en el sitio de toma de muestra (*point-of-care*; POC) mediante la plataforma actual de la **inmuncromatografía** (LFA, de sus siglas en inglés *Lateral Flow Assay*) [93-95]. La inmuncromatografía es una plataforma versátil que actualmente se usa en la mayoría de los ensayos POC por ser un ensayo rápido, fácil de llevar a cabo, con una gran estabilidad y de bajo coste, además de no necesitar equipamientos especiales para obtener el resultados [96]. En esta tecnología, el reconocimiento antígeno-anticuerpo se produce en la superficie de partículas de látex, oro coloidal o carbono, y se basa en la migración por capilaridad de la muestra líquida y los complejos analito-látex formados a través de una membrana de nitrocelulosa. De este modo, el resultado del ensayo se evidencia con la aparición de líneas sobre la tira de inmuncromatografía [97].

Así mismo, otras técnicas inmunológicas disponibles y de amplia utilización para la detección directa de un patógeno son la **inmunoquímica** (IHC) o la **inmunofluorescencia** (IFA) que permiten el reconocimiento del patógeno *in situ* en distintos tejidos. Esta tecnología se basa en el mismo principio que los ensayos ELISA, mediante la utilización de un anticuerpo específico marcado con fluorescencia o con una enzima que genere un cambio colorimétrico. En este caso, el ensayo se desarrolla sobre secciones histológicas, generalmente obtenidas de tejidos u órganos fijados con formalina y embebidos en parafina. Presenta varias ventajas: facilidad de envío de muestras, seguridad en su manipulación, permite la realización de estudios retrospectivos y la detección de organismos no cultivables. Para el desarrollo de este tipo de ensayos es necesario disponer de anticuerpos monoclonales altamente específicos y sensibles [35, 98-100]. La IHC o IFA son tecnologías versátiles que se aplican también a la detección de anticuerpos en su variante indirecta. En esta variante, el ensayo se desarrolla sobre una monocapa de células de cultivo o una sección histológica que hayan sido previamente infectadas con el patógeno a detectar. Sobre la sección se añadirá el suero o la muestra problema en la que se quiere determinar la presencia o ausencia de anticuerpos y, del

## ***Introducción***

mismo modo que en el ELISA indirecto, el ensayo se revelará con un anticuerpo específico de especie marcado [101].

Así mismo, se han descrito muchos otros ensayos inmunológicos para la detección de anticuerpos basados en la capacidad de las Ig de inhibir funciones de los patógenos; como son la neutralización de virus (inhibición de la capacidad de reconocer y asociarse a las células), inhibición de actividades enzimáticas presentes en la superficie de los patógenos o basados en el simple reconocimiento de antígeno-anticuerpo como la hemaglutinación. Muchos de estos ensayos se emplean de rutina en laboratorios de diagnóstico por su sensibilidad, sirviendo como métodos de referencia.

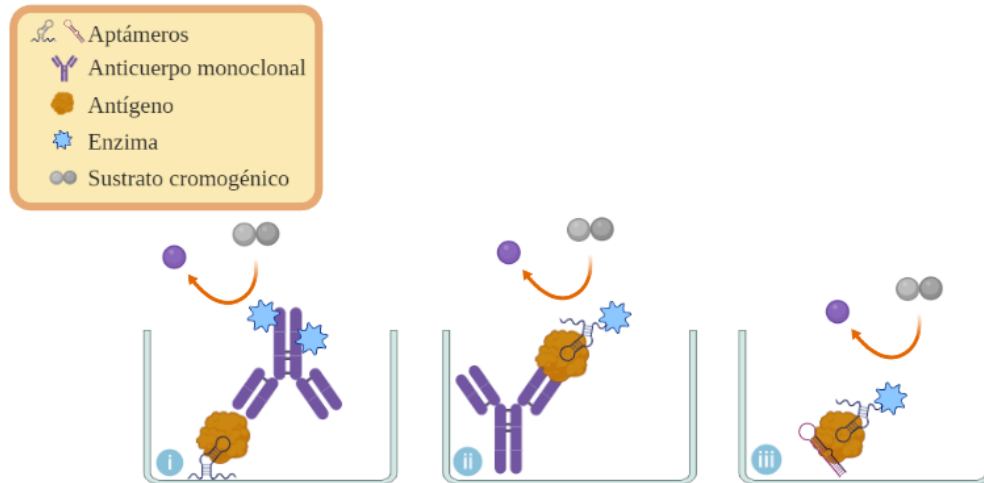
Las moléculas detectoras alternativas a los anticuerpos que han surgido en las últimas décadas presentan un gran potencial para complementar a la técnica ELISA o incluso mejorarla en los casos en que la sensibilidad de los anticuerpos no sea suficiente. En concreto, los aptámeros presentan la posibilidad de reemplazar o complementar el papel de los anticuerpos en los distintos formatos ELISA descritos, pudiendo actuar tanto de molécula captadora reemplazando al anticuerpo en el ensayo DAS-ELISA, como de molécula detectora reemplazando al anticuerpo en DAS-ELISA o ELISA indirecto. Así, recientemente, han surgido los ensayos basados en aptámeros para el diagnóstico de enfermedades infecciosas habitualmente conocidos como ELASA (de las siglas en inglés *Enzyme-Linked Apta-Sorbent Assay*) que pueden presentar distintos formatos al igual que sucedía con el ELISA, destacando los formatos ELASA indirecto y ELASA tipo sándwich que se obtienen al sustituir los AcMs empleados en los desarrollos de los ensayos ELISA [102, 103].

- **ELASA tipo sándwich**

El ensayo ELASA tipo sándwich puede presentar distintas variaciones en función de que el aptámero empleado reemplace a uno de los anticuerpos descritos para el DAS-ELISA (captador o revelador) o a ambos [Figura I.9]. El ELASA tipo sándwich es un método de diagnóstico directo ya que detecta alguna de las proteínas del patógeno en la muestra. A las ventajas descritas previamente para el DAS-ELISA habría que añadir en este caso las ventajas que proporciona el uso de aptámeros en el diagnóstico: los aptámeros se obtienen por un proceso de selección *in vitro*, se pueden desarrollar frente a proteínas no-inmunogénicas con rangos de especificidad similares a los anticuerpos o

en algunos casos mayores ( $K_{ds}$  en el rango picomolar), la selección de los aptámeros puede realizarse en condiciones no fisiológicas que se asemejen más a las establecidas para el desarrollo del ensayo, pueden obtenerse frente a cualquier tipo de molécula y, además, el proceso de obtención es mucho más rápido y barato que el de los anticuerpos. Al tratarse de moléculas de ADN o ARN, pueden modificarse de forma sencilla para favorecer el recubrimiento de placas de distintas naturalezas y favorecer la orientación de las moléculas o para ser usada como molécula reveladora y tras sufrir un proceso de desnaturalización recuperan su estructura, cosa que no sucede con los anticuerpos. Así mismo, algunos estudios hablan de la capacidad de reutilizar estas moléculas tras desarrollar el ensayo como potenciales ventajas para el uso de aptámeros en el futuro [104, 105].

En la última década, el número de publicaciones relacionadas con este tipo de desarrollo se ha visto incrementado, mostrando el creciente interés por estos anticuerpos sintéticos. La mayoría de las publicaciones, sin embargo, se han desarrollado en el ámbito diagnóstico humano, encontrando muy pocos artículos que hagan referencia al ámbito veterinario [106-109].



**FIGURA I.9 | Esquema de varios formatos de ELISA tipo sándwich. i.** Aptámero como molécula capturadora, **ii.** Aptámero como molécula reveladora o **iii.** Reemplazo total de anticuerpos del DAS-ELISA, uso de aptámeros como molécula capturadora y reveladora. Creado con [www.BioRender.com](http://www.BioRender.com).

- **Ensayos múltiples**

Para solventar la mayor limitación de los métodos de diagnóstico descritos, que detectan patologías individuales requiriendo una escrupulosa examinación clínica, se ha trabajado en el desarrollo de nuevas tecnologías de diagnóstico que permitan el análisis de varios patógenos de forma simultánea. Estas **herramientas de diagnóstico múltiple** mejoran las capacidades de cribado de alto rendimiento de los ensayos moleculares, permiten testar una muestra frente a un amplio panel de patógenos ante una sospecha clínica y facilitan la realización de estudios epidemiológicos. Comparado con los ensayos descritos anteriormente, los ensayos múltiples presentan las siguientes ventajas: permiten el análisis simultáneo y diferencial de varios analitos dentro de una determinada muestra, reduciendo el tiempo, los costes y la variabilidad entre ensayos individuales para llegar al mismo resultado. Además, en el diagnóstico de una única enfermedad, la posibilidad de chequear varias dianas permite realizar diagnósticos más precisos. Sin embargo, este tipo de tecnologías requiere de una mayor inversión inicial en la mayoría de los casos, al incorporar diversas moléculas detectoras y equipos más sofisticados. Requieren una mayor optimización y validación, puesto que pueden generar más problemas de reactividad cruzada que los ensayos individuales [110, 111]. Actualmente entre las plataformas más ampliamente empleadas para el diagnóstico múltiple encontramos la PCR y los microarrays.

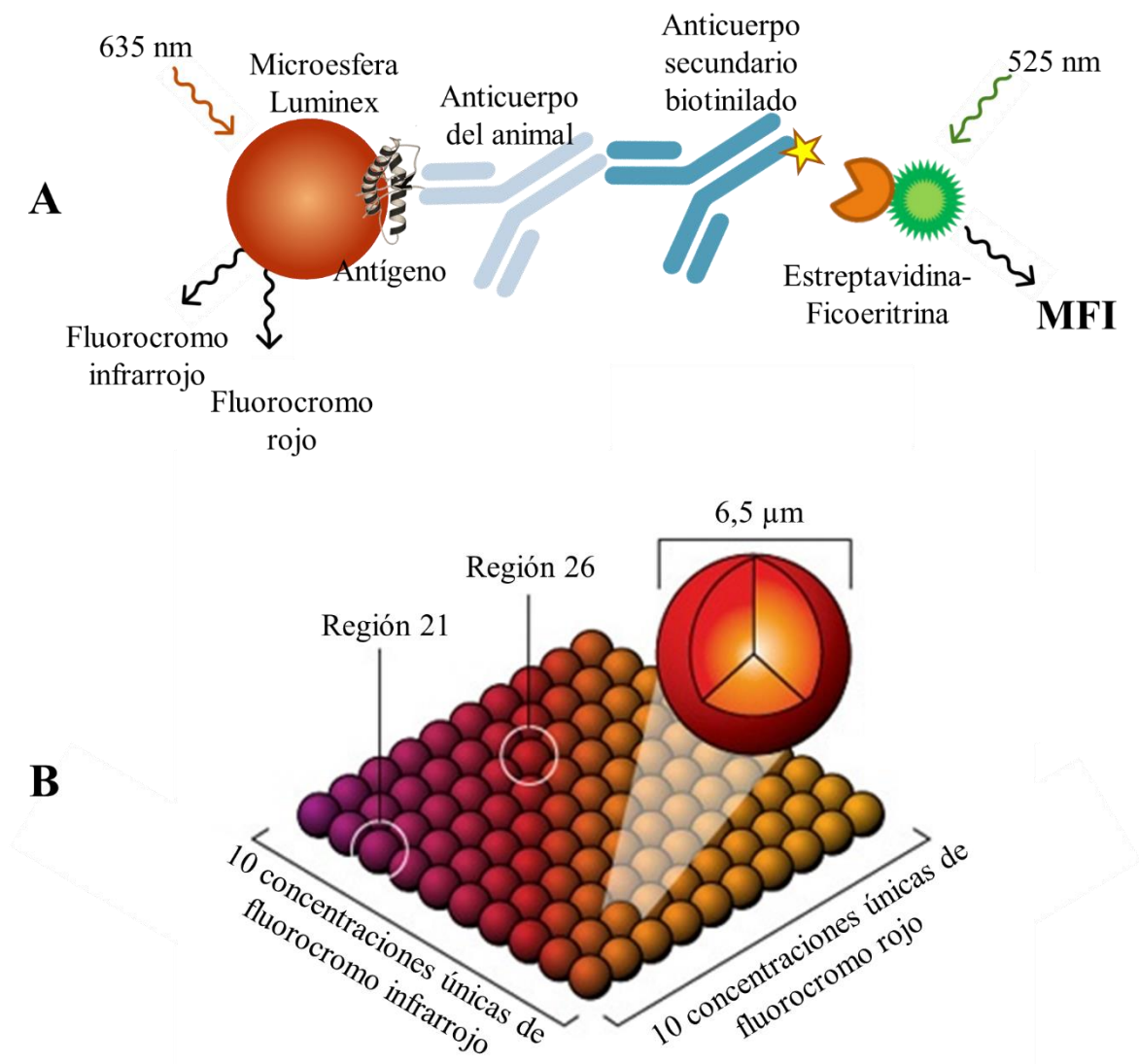
La tecnología de **microarrays** surgió en 1995 con la impresión sobre una placa de vidrio de microscopio de varias secuencias de ADN complementarias a regiones de interés [112]. Actualmente un microarray está formado por una serie de moléculas captadoras inmovilizadas sobre una superficie sólida, ocupando cada una de ellas una posición concreta. Cada una de las moléculas captadoras unirá su analito diana de una mezcla compleja, y seguidamente, una molécula marcada permitirá detectar y cuantificar los analitos unidos. De este modo, la intensidad de señal (cambio colorimétrico, fluorescencia...) observada en una posición concreta de la superficie del ensayo se correlacionará con la concentración de un único analito en la muestra [113]. Desde su desarrollo, la tecnología de microarrays ha ido evolucionando tecnológicamente (con la impresión de oligonucleótidos, sondas fluorescentes o proteínas; o con el uso de nuevas superficies para la impresión) ampliando así su marco de implantación [114]. Aplicado al diagnóstico de enfermedades infecciosas, un microarray permite la detección diferencial y simultánea de diversos patógenos o anticuerpos frente a los mismos en una

misma muestra, reduciendo los costes del proceso y la variabilidad. Los microarrays de proteínas se emplean cada vez más en el área de las enfermedades infecciosas, tanto para encontrar nuevos biomarcadores o dianas de las respuestas inmunes como para el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico múltiple. Son herramientas conocidas, de aplicación sencilla en los laboratorios de diagnóstico habituales y susceptibles de realizarse siguiendo las distintas aproximaciones descritas para los ensayos ELISA (formato indirecto o sándwich). Al igual que sucedía en el ELISA, la cantidad de analito inmovilizada en el punto es proporcional a la concentración en la muestra, por lo que los microarrays son técnicas de diagnóstico cuantitativas. A nivel teórico, los microarrays no muestran limitación en el número de moléculas captadoras impresas, aunque los microarrays disponibles comercialmente no superan las 20, y han mostrado que la miniaturización de la superficie de impresión permite aumentar en muchos casos la sensibilidad del ensayo [115, 116].

Una alternativa a estos microarrays planos surgida en las últimas décadas es la tecnología de los **ensayos múltiples basados en microesferas** (BBMAs) o microarrays en suspensión, comercializada bajo el nombre de “xMAP Technology” (Luminex). Esta tecnología se basa en el uso de microesferas de poliestireno de 6,5  $\mu\text{m}$  de diámetro marcadas internamente por una ratio único de dos fluorocromos. Sobre estas microesferas de elevado ratio área:volumen se unen covalentemente las moléculas captadoras específicas de los analitos a detectar (oligonucleótidos, antígenos, anticuerpos...) y se añaden combinadas en un pocillo de una placa de microtitulación [117]. En este caso, la reacción de reconocimiento antígeno-anticuerpo sucede sobre la superficie de las microesferas y las moléculas detectoras son marcadas mediante una señal fluorescente [Figura I.10A]. Mediante un sistema de láseres y procesamiento de imágenes, esta plataforma permite identificar de forma individual las microesferas y determinar la señal fluorescente superficial de las moléculas detectoras sobre cada grupo de ellas. En primer lugar, un láser de 635 nm de longitud de onda excita los dos fluorocromos que marcan internamente las microesferas. Estos fluorocromos emiten a dos longitudes de onda distintas, de modo que identificando la concentración de cada uno de ellos, la tecnología permite identificar la región de microesfera estudiada [Figura I.10B]. Y, seguidamente, incide sobre las microesferas un láser de 525 nm de longitud de onda que excita a la ficoeritrina empleada en el revelado de las moléculas detectoras, recogiendo su emisión como intensidad de fluorescencia asociada a la región concreta identificada. De esta forma, la tecnología

## Introducción

Luminex permite cuantificar la presencia de entre 50 y 500 analitos de forma simultánea [118, 119] [Figura I.10]. Los microarrays en suspensión presentan una gran reproducibilidad, una elevada sensibilidad y grandes posibilidades de flexibilizar los ensayos, seleccionando de forma independiente los analitos a detectar en cada muestra. Actualmente, los BBMA se aplican de forma habitual a medicina humana, microbiología alimentaria y en detección de patógenos de plantas habiendo mostrado su capacidad de análisis múltiple con la detección simultánea de varios cientos de analitos [120]. Sin embargo, su aplicación al área veterinaria es mucho más limitada.



**FIGURA I.10 | Tecnología Luminex de microarrays en suspensión.** **A.** Esquema del ensayo de microarray en suspensión en formato indirecto para detección de anticuerpos específicos frente a un patógeno. **B.** Panel de microesferas resultante de la excitación de los dos fluorocromos internos. Adaptada de Luminex corp. [121].

## **I. 6. Patologías de interés en ganado porcino**

En el presente trabajo de tesis se ha trabajado como modelo con algunas de las enfermedades más importantes que afectan al ganado porcino, como son las patologías digestivas, respiratorias y sistémicas que se describen a continuación.

### **I. 6. 1 Patologías digestivas**

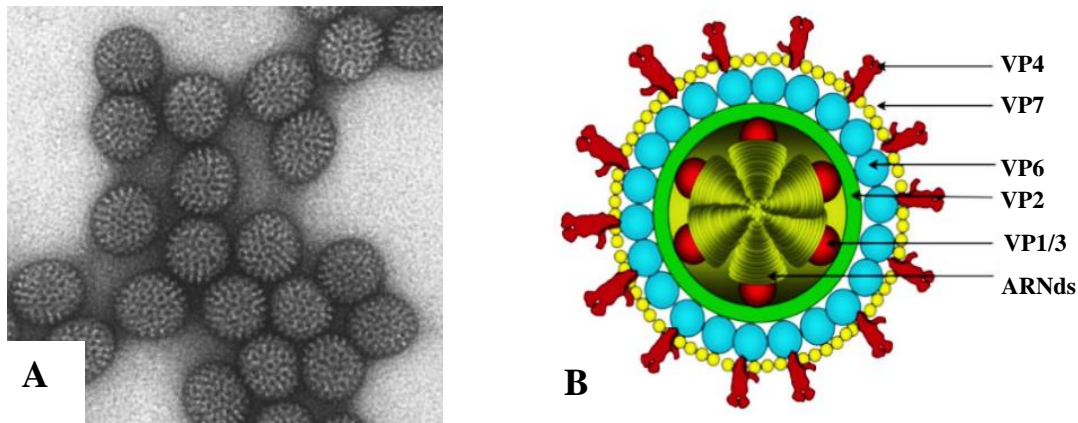
La diarrea vírica aguda es una enfermedad epizootica que pone en peligro la industria porcina con una elevada morbilidad y mortalidad, especialmente entre lechones, resultando en enormes pérdidas económicas. Esta patología se caracteriza por la presencia de diarrea acuosa, vómitos y deshidratación. Los agentes que causan más habitualmente este tipo de cuadros clínicos son el virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV), el virus de la gastroenteritis transmisible (TGEV), ambos coronavirus porcinos, y el rotavirus porcino tipo A (PRVA) [122, 123].

Debido a la similitud de los cuadros clínicos que cursan con este tipo de diarrea, la identificación del agente causal de la infección debe realizarse en el laboratorio a partir de un diagnóstico diferencial [124]. En este trabajo, se han desarrollado nuevos métodos diagnósticos para la detección de uno de los patógenos implicados en este cuadro: PRVA.

- **Rotavirus porcino grupo A (PRVA)**

Los *Rotavirus* constituyen un género dentro de la familia Reoviridae. Su material genético consta de 11 moléculas de ARN de doble cadena (ARNds) que codifican para 6 proteínas estructurales y 5 no estructurales. Las partículas virales tienen un diámetro aproximado de 75 nm y constan de una triple cápsida icosaédrica formada por distintas proteínas estructurales; las proteínas VP1, VP2 y VP3 forman el core del virus empaquetando el material genético, la proteína VP6 forma una cápsida intermedia y, por último, las proteínas VP4/VP7 forman la capa externa de las partículas virales [125, 126] [Figura I.11].

## Introducción



**FIGURA I.11 | Rotavirus porcino.** A. Fotografía de microscopía electrónica de las partículas virales de Rotavirus [127] B. Esquema de la partícula viral de Rotavirus [128].

En base a la relación antigénica de sus proteínas VP6 estos virus se clasifican en 10 grupos (A-J), siendo los de los grupos A, B y C los más comunes que aparecen infectando a humanos y animales, con mayor prevalencia para los rotavirus del grupo A (PRVA) [126]. A su vez, dentro de los distintos grupos, el genotipado se realiza en base a las proteínas de la cápsida externa en un sistema dual G (VP7) y P (VP4) [125]. Dado que la proteína VP6 tiene un papel fundamental en la clasificación de los rotavirus en grupos, así como en la formación de la partícula viral, fue la seleccionada para el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos [129].

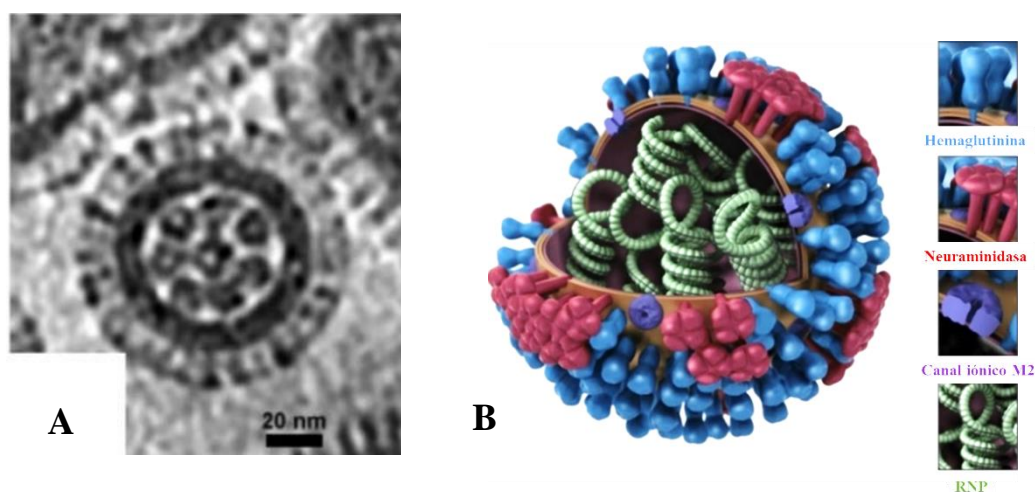
### I. 6. 2 Patologías respiratorias

El complejo respiratorio porcino (PRDC, de las siglas en inglés *Porcine Respiratory Disease Complex*) es uno de los problemas de salud más importantes que afectan a la industria porcina en todo el mundo y es responsable de importantes pérdidas en este sector [130]. El término PRDC hace referencia a un cuadro clínico caracterizado por una disminución en la ingesta alimentaria, fiebre, tos y disnea en los animales que lleva a una disminución del crecimiento y una reducción en la eficiencia alimentaria. Su morbilidad varía entre el 10 y el 70% con una mortalidad entre el 2 y el 20% [131, 132]. Este cuadro clínico está causado por una combinación de agentes infecciosos (virus o bacterias) y factores ambientales y de gestión en las granjas. Desde el punto de vista infeccioso, este síndrome rara vez se asocia con un único patógeno, siendo lo más habitual encontrar sobreinfecciones con distintos microorganismos [130-133]. Estos microorganismos pueden clasificarse en agentes primarios que activan y debilitan los

mecanismos de defensa del animal (daños en el epitelio de las vías respiratorias superiores, el parénquima pulmonar, alteraciones del sistema inmune...), y en agentes secundarios u oportunistas que se aprovechan de la debilidad del animal para establecer infecciones secundarias [134]. A pesar de que en la mayoría de los casos los agentes primarios pueden generar un cuadro clínico de medio a severo en el animal por sí mismos, esta coinfección supone el agravamiento de la patología, pudiendo incluso obtenerse efectos sinérgicos por la depresión del sistema inmune, alteraciones en la funcionalidad de los macrófagos o la respuesta de citoquinas y la obstaculización del aclaramiento mucociliar [134, 135]. Generalmente, los agentes más habituales que se encuentran en las granjas causando estas infecciones primarias son el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV), circovirus porcino tipo 2 (PCV2), virus Influenza porcino (SIV) y *Mycoplasma hyopneumoniae* [10, 135].

- **Virus Influenza porcino (SIV)**

Los virus Influenza pertenecen a la familia Orthomyxoviridae, distinguiéndose distintos géneros en base a la secuencia génica de los virus. Todos ellos tienen un genoma formado por 8 moléculas de ARNs y polaridad negativa (-) que codifica para 11 o 12 proteínas virales. La partícula viral está formada por una membrana bilipídica derivada de la membrana plasmática en la que se encuentran una serie de proteínas de membrana: hemaglutinina (H), neuraminidasa (N) y proteínas de la matriz (M1 y M2). El núcleo del virus consiste en ribonucleocápsidas (RNP) helicoidales formadas por el ARN viral empaquetado con nucleoproteína (NP) [136-139] [Figura I.12].



**FIGURA I.12 | Virus Influenza.** A. Fotografía de microscopía electrónica de Influenzavirus A editada de [140]. B. Esquema de la partícula viral, adaptada de York *et al.*, 2019 [141].

## ***Introducción***

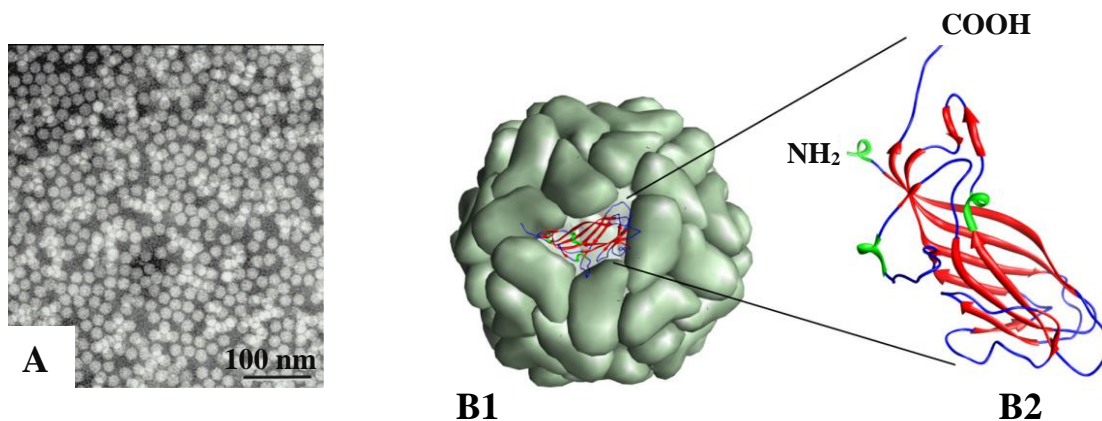
Estos virus se han clasificado dentro de 4 géneros distintos: *Influenzavirus A*, *B*, *C* y *D* en base a las proteínas NP y M1, con unos determinantes antigénicos ampliamente conservados dentro de cada género [142, 143]. De todos ellos, *Influenzavirus A* o *Alphainfluenzavirus* es el de mayor importancia a nivel de salud pública por su capacidad de causar tanto epidemias estacionales ampliamente extendidas, como pandemias originadas por infecciones zoonóticas [141]. A su vez, estos virus pueden clasificarse en subtipos en base a la antigenicidad de sus proteínas de membrana: H (17 isoformas descritas) y N (9 formas distintas) que pueden combinarse dando paso a distintos subtipos [138]. Los virus de Influenza porcinos (SIV) que se encuentran actualmente circulando a nivel mundial son los subtipos de *Influenzavirus A*: H1N1, H3N2 y H1N2, mostrando importantes diferencias antigénicas entre continentes incluso dentro de un mismo subtipo [144, 145]. Para el desarrollo de nuevos tests diagnósticos, en este trabajo se seleccionó la NP de *Influenzavirus A*, a fin de detectar todas las infecciones provocadas por los distintos virus Influenza A en ganado porcino.

- ***Mycoplasma hyopneumoniae***

*Mycoplasma hyopneumoniae* es una bacteria perteneciente al género *Mycoplasma*. Del mismo modo que otras bacterias de este género, son bacterias pequeñas, con un genoma reducido, carecen de pared celular y son pleiomórficas [146]. Son bacterias intracelulares que actúan como parásitos, lo que favorece que escapen al sistema inmune, y aparecen afectando a todo tipo de seres vivos [147]. El genoma de *M. hyopneumoniae* codifica para varias proteínas inmunodominantes entre las que se encuentran: la proteína citosólica P36; las proteínas de membrana P46, P65 y P74; y la adhesina P97, que generan una respuesta temprana de anticuerpos en los animales [148]. Entre ellas, la proteína P46 aparece como una lipoproteína de superficie altamente específica de especie y con bajos niveles de reactividades cruzadas con otros *Mycoplasma* que pueden aparecer en esta especie como *M. flocculare* y *M. hyorhinis* [149], por lo que fue la seleccionada para el desarrollo de métodos diagnósticos.

- **Circovirus porcino tipo 2 (PCV2)**

Los circovirus porcinos (PCVs) pertenecen al género *Circovirus* dentro de la familia Circoviridae. Son virus no envueltos, con una molécula de ADN de cadena sencilla (ADNs) circular que se observan como partículas icosaédricas de 15-20 nm. Son de los virus más pequeños conocidos capaces de infectar a mamíferos, cuya envuelta se encuentra formada por la única proteína estructural del virus, la proteína de la cápsida (Cap) [150, 151] [Fig. I.13].



**FIGURA I.13 | Circovirus porcino tipo 2.** **A.** Fotografía de microscopía electrónica de las partículas virales de PCV2 [150]. **B1.** Esquema de la partícula viral de PCV2 y **B2** de la estructura tridimensional de la proteína Cap [152].

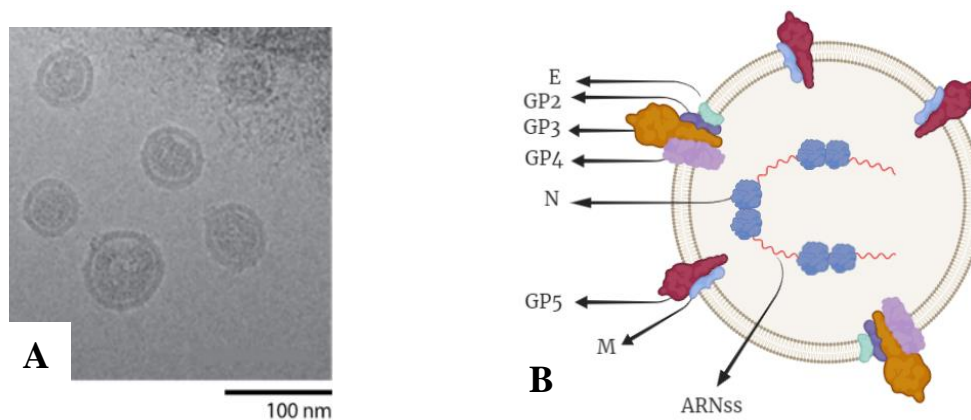
Actualmente se han descrito hasta 4 grupos de circovirus porcinos: tipo 1 (PCV1), tipo 2 (PCV2), tipo 3 (PCV3) y tipo 4 (PCV4) [153]. De todos ellos, el único que se ha relacionado con el desarrollo de un cuadro clínico es el PCV2, cuyas mayores diferencias con el resto se encuentran en la Cap [150, 154]. Esta proteína de 233-234 aminoácidos constituye el homopolímero que forma la cápsida viral. En base a las diferencias encontradas en el gen ORF2 codificante para la proteína Cap, los PCV2 se dividen en, al menos, 8 subtipos denominados PCV2a-h que muestran una identidad compartida en esta proteína del 90%, lo que genera diferencias fenotípicas y de patogenicidad entre los grupos [154]. Estos subtipos presentan variaciones en cuanto a su prevalencia a lo largo de los años. El PCV2a fue el más prevalente durante los años 1990s, tras lo cual, pasó a serlo el PCV2b, con un cambio del genotipo producido alrededor de 2003. La aparición del PCV2b en América del Norte y Europa se asoció con ratios de mortandad de hasta el 50 %. Desde 2012, ha aumentado la detección del genotipo PCV2d entre la población porcina, resultado de un cambio de genotipo producido en torno a 2012. Los genotipos

## Introducción

PCV2c y PCV2e se consideran de importancia menor y los genotipos PCV2f-h no se han estudiado en tanta profundidad. A pesar de los cambios sufridos durante los años, actualmente PCV2a, PCV2b y PCV2d son los más prevalentes entre la población porcina, siendo los de mayor significancia clínica a nivel global [155]. Por todo ello, se seleccionó la proteína Cap de PCV2a como candidata para el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos.

- **Virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV)**

PRRSV es un virus perteneciente al género *Arterivirus* dentro de la familia Arteriviridae. Es un virus envuelto, cuyo genoma está formado por una molécula de ARNss de polaridad positiva (+). El virión presenta forma esférica u ovalada, con un diámetro de alrededor 50-60 nm, contiene el material genético empaquetado con proteínas de la nucleocápsida (N). Envolviendo este virión se encuentra la membrana con una serie de glicoproteínas (GP), la proteína de membrana (M) y la proteína de la envuelta (E) insertadas en la bicapa lipídica [Figura I.14] [156].



**FIGURA I.14 | Virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino.** A. Fotografía de microscopía electrónica de las partículas virales de PRRSV [156]. B. Esquema de la partícula viral de PRRSV, figura original basada en Kvisgaard, 2013 [157] creada con [www.BioRender.com](http://www.BioRender.com).

Debido a la elevada tendencia a los errores de la ARN polimerasa del virus, PRRSV ha experimentado grandes procesos evolutivos a lo largo del tiempo llevando a la aparición de varias cepas virulentas y una elevada diversidad genotípica. Originariamente, estos virus se clasificaron en dos genotipos: PRRSV-1 (descrito por primera vez en Europa) y PRRSV-2 (descrito por primera vez en América), con grandes

variaciones genéticas incluso dentro del mismo grupo. En las últimas revisiones taxonómicas, las variaciones genéticas descritas entre ambos genotipos han llevado, a que dichos genotipos se consideren especies independientes [158]. La proteína estructural más abundante es la proteína de la nucleocápsida (N), codificada por el marco de lectura 7 (ORF7) [159]. La región codificante de dicha proteína es una de las zonas más conservadas dentro del genoma del virus con un porcentaje de identidad de aminoácidos del 96-100 % dentro de aislados PRRSV-2 y del 94-96 % dentro de aislados PRRSV-1. Sin embargo, al comparar estas identidades entre aislados de PRRSV-1 y PRRSV-2, el porcentaje cae a un 59-63 % [159]. Varios estudios han demostrado que dentro de esta proteína se encuentran muchos dominios antigénicos compartidos entre los dos tipos o distintivos de uno de ellos [159-162], por lo cual esta proteína fue la diana seleccionada para la puesta a punto de los nuevos métodos diagnósticos.

### I. 6. 3 Otras patologías relevantes en ganado porcino

Además de las patologías respiratorias y digestivas descritas anteriormente, en el presente trabajo de tesis doctoral se ha trabajado con otras patologías de gran interés para la industria porcina como son la peste porcina africana y la peste porcina clásica, dos patologías de declaración obligatoria a la OIE, por las grandes consecuencias económicas y sanitarias que provocan en el ganado porcino; la tuberculosis, una importante enfermedad zoonótica que afecta a distintas especies animales y a humanos y es endémica en España y, con motivo de la colaboración establecida con el instituto Friedrich-Loeffler, se incorporó al panel de vigilancia la hepatitis E, una nueva enfermedad zoonótica de interés, poco estudiada, sobre la que es necesario realizar más estudios en ganado porcino.

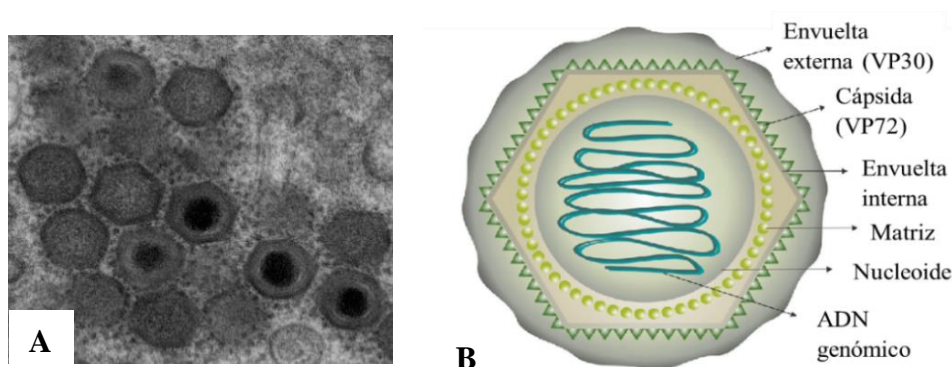
- **Peste porcina africana (ASF)**

La peste porcina africana (ASF del inglés *African Swine Fever*) es una enfermedad infecciosa, altamente contagiosa entre la población porcina, caracterizada por el desarrollo de una respuesta inmune exacerbada que persiste por largos periodos de tiempo [163]. La infección se relaciona con un amplio rango de síndromes clínicos que van desde una enfermedad asintomática a fiebres hemorrágicas con elevada tasa de mortalidad, que pueden llegar al 100%, en función de la virulencia de la cepa y las características inmunológicas del hospedador [164, 165].

## Introducción

La peste porcina africana se describió por primera vez en Kenia en 1921 [166] y, rápidamente, se extendió a otros países africanos, europeos y de América central y del Sur [167]. La enfermedad fue erradicada exitosamente de estos territorios a excepción de Cerdeña y algunos países sub-saharianos donde sigue siendo endémica [168]. En abril de 2007, la enfermedad se extendió del este de África a la República de Georgia y se extendió por la región del Cáucaso, Rusia y Europa del este, donde el virus ha continuado circulando, registrándose una notificación continua de casos sobre todo en los países de Europa del este [169-171]. En agosto de 2018 la enfermedad se notificó por primera vez en China, transmitiéndose rápidamente por los países vecinos. A finales de septiembre de 2019 se habían notificado casos en casi todos los países del sudeste asiático y, lejos de controlar la infección por este virus, en 2020 se notificó el primer caso de ASFV en Alemania, junto a la frontera con Polonia, reforzando las advertencias de la FAO ante el incremento de notificaciones sobre el peligro de la transmisión del virus [169, 170, 172, 173].

La enfermedad está causada por el virus de la peste porcina africana (ASFV), que es el único miembro de la familia Asfarviridae [174]. Su genoma está formado por una molécula de ADN de doble cadena (ADNs) que codifica para 150-167 polipéptidos distintos [124]. Este virus envuelto de 200 nm de diámetro consta de más de 68 proteínas estructurales, que se organizan en distintas capas: (1) el core está formado por el nucleoide y una densa capa proteica que lo empaqueta, (2) la envuelta interna que consta de dos bicapas lipídicas y deriva del retículo endoplasmático, (3) rodeando a ésta aparece la cápsida, cuyo componente mayoritario es la VP72 y, por último, (4) la envuelta externa, una bicapa lipídica derivada de la membrana plasmática [175-177][Figura I.15].



**FIGURA I.15 | Virus de la peste porcina africana. A.** Fotografía de microscopía electrónica de ASFV [173]. **B.** Estructura de la partícula viral del ASFV. Adaptada de Freitas *et al.*, 2018 [178].

Dada la gran complejidad de este virus, a lo largo de los años se han propuesto diversas proteínas como candidatas para el diagnóstico de la enfermedad [173, 176, 177]. La primera proteína que se describió como candidata al diagnóstico fue la VP72. Más adelante se identificaron las proteínas p30 (VP30) y p54 (VP54), por ser altamente antigénicas durante la infección, y más recientemente se ha propuesto como candidata la poliproteína pp62 [177, 179]. ASFV no es un virus altamente variable, las diferencias en tamaño de su genoma se deben principalmente a la ganancia o pérdida de marcos de lectura no esenciales o a variaciones en las regiones repetidas en tándem. La clasificación en genotipos se realiza en base a la proteína VP72 [174]. Ante la gran complejidad antigénica de este virus, en este trabajo se han empleado dos dianas, las proteínas VP72 y VP30, para el diagnóstico de la enfermedad a través de distintas estrategias. La selección de estos antígenos se realizó por ser las proteínas más inmunogénicas del virus y las dianas empleadas habitualmente en la detección de anticuerpos [171, 177, 179]. Hasta la fecha, no se ha conseguido desarrollar una vacuna eficaz, de modo que la detección de anticuerpos es un indicador directo de la infección por el ASFV.

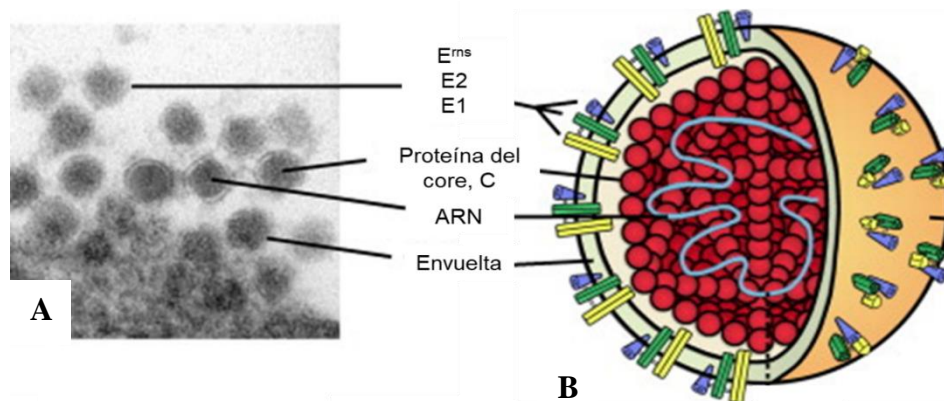
- **Peste porcina clásica (CSF)**

La peste porcina clásica (CSF, de las siglas en inglés *Classical Swine Fever*) es una enfermedad altamente contagiosa del ganado porcino que se manifiesta clínicamente de una forma indistinguible a la peste porcina africana. Se presenta con distinta sintomatología, que puede ser inaparente o dar lugar a cuadros agudos que terminan con la muerte del animal, dependiendo en gran medida de la virulencia de la cepa y la susceptibilidad del hospedador [180, 181].

Esta enfermedad se describió por primera vez en Ohio, EEUU, en 1833 [182] y se expandió a otros países de América y Europa en pocos años [183]. Tras el desarrollo de una vacuna efectiva y la aplicación de estrictos programas de control, la enfermedad fue erradicada de muchos países, aunque sigue teniendo un importante impacto en Asia, Europa del este, y muchos países de América central y del Sur [184, 185]. En los últimos años se han producido brotes en algunos países de Europa del Este, Mongolia, Rusia, Corea del Sur, Japón, Brasil y Colombia debido a la reintroducción a través de jabalíes salvajes [170, 180].

## Introducción

El agente causal de esta patología es el virus de la peste porcina clásica (CSFV), perteneciente al género *Pestivirus* dentro de la familia Flaviviridae. Su material genético está formado por una molécula de ARNss y polaridad positiva [181]. Es un virus envuelto, formado por cuatro proteínas estructurales: la proteína del core (C) que encapsula el material genético y tres glicoproteínas de envuelta: E1, E2 y E<sup>ms</sup> también denominada E0 [186, 187] [Figura I.16].



**FIGURA I.16 | Virus de la peste porcina clásica.** A. Fotografía de microscopía electrónica de CSFV. B. Esquema de la partícula viral de CSFV, adaptada de Beer *et al.*, 2007 [187].

De todas las proteínas estructurales, la proteína E2 es la más inmunogénica y juega importantes papeles dentro del ciclo viral. La E2 es capaz de producir anticuerpos neutralizantes y es una proteína altamente conservada dentro del género, lo que genera un alto nivel de reactividades cruzadas con otros *Pestivirus* como BVDV y BDV (de sus siglas en inglés Bovine Viral Diarrhea Virus y Border Disease Virus, respectivamente) [188, 189].

Por el impacto que tanto ASFV como CSFV tienen sobre el ganado porcino, y las consecuentes pérdidas económicas, la infección por ambos virus es de notificación obligatoria a la OIE. Teniendo en cuenta la imposibilidad de diferenciar por análisis clínico o post-mortem estas dos enfermedades, así como la alta probabilidad de encontrar a ambos virus circulando por las mismas zonas geográficas, se hace evidente la necesidad de disponer de herramientas de laboratorio para el diagnóstico diferencial. A día de hoy esta diferenciación se hace a través de diagnóstico directo por RT-PCR [190, 191] o indirecto a través de la detección específica de anticuerpos [192].

- **Tuberculosis (TB)**

La tuberculosis (TB) es una importante enfermedad zoonótica causada por las bacterias pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC), que son capaces de infectar a un amplio rango de mamíferos [193]. Dentro de las bacterias de este complejo se incluyen diversas bacterias pertenecientes al género *Mycobacterium* como *Mycobacterium bovis*, *M. tuberculosis* y el complejo de *M. avium* [194]. En porcino, la infección suele estar provocada por *M. bovis* en aquellos países con alta incidencia de TB bovina. La infección se produce principalmente por vía oral debido a la ingesta de leche o productos lácteos de una vaca infectada o fecal-oral, pudiendo afectar tanto a cerdos como a jabalíes salvajes. Una vez dentro del organismo, las bacterias evaden la respuesta inmune y su eliminación, al residir dentro de los macrófagos [195]. La infección puede cursar de forma localizada sin síntomas clínicos, o puede ir generando una enfermedad crónica debilitante caracterizada por la formación de granulomas nodulares o tubérculos en los nodos linfáticos, pulmones, intestinos, hígado, bazo, pleura y peritoneo. En muchos casos, esta infección en porcino cursa de forma asintomática y no necesita tratamiento, lo que les convierte en reservorios [196, 197]. Las lesiones provocadas por las distintas bacterias del MTC son indistinguibles por análisis post-mortem, de modo que la evaluación de laboratorio es imprescindible para el diagnóstico diferencial [198].

Debido al alto impacto que la TB tiene en distintas industrias y a su papel zoonótico, la TB bovina es una enfermedad de declaración obligatoria a la OIE y, como tal, ha sido sometida a estrictos programas de erradicación en la Unión Europea durante muchos años. A pesar de los esfuerzos, sigue siendo endémica en muchos países y su prevalencia ha aumentado incluso durante los últimos años. En España la TB tiene gran importancia debido a la alta prevalencia en especies salvajes (jabalíes y ciervos) susceptibles de infectarse y actuar como vectores, lo que hace que la enfermedad no haya sido erradicada, mostrando una incidencia especialmente elevada en el sur de la península [193, 195, 199].

Las mycobacterias son un grupo de bacilos aerobios Gram-positivos y no esporulados capaces de vivir durante largos periodos de tiempo en diversos hospedadores o en el ambiente. Presentan en su superficie una serie de proteínas susceptibles de ser antigénicas entre las cuales las proteínas MPB83 y MPB70 son las serodominantes como se ha mostrado en múltiples estudios [200-202]. Durante los últimos años, algunos estudios han mostrado que los inmunoensayos basados en un único antígeno pueden

## ***Introducción***

mostrar una reducción en la sensibilidad diagnóstica debido a la diversidad de organismos que causan esta infección [202].

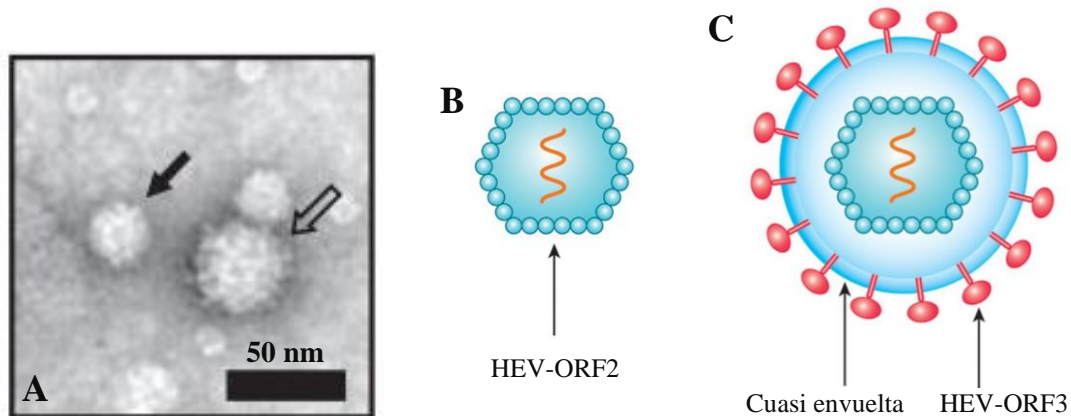
- **Hepatitis E**

La hepatitis E se descubrió en 1983, tras estudiar un brote de 1978 de hepatitis transmitida por el agua que se detectó en 200 pueblos en el valle de Kashmir, India, afectando a humanos. Los pacientes mostraban signos clínicos compatibles con la infección causada por el virus de la hepatitis A (HAV), pero no mostraban anticuerpos frente al HAV ni frente al virus de la hepatitis B (HBV) [203]. Al igual que en las hepatitis causadas por HAV, la vía de transmisión es principalmente fecal-oral por aguas contaminadas y causa una enfermedad autolimitada que, en la mayoría de los pacientes dura unas semanas. La mayor parte de las infecciones (>95 %) cursan de forma asintomática, pero también pueden aparecer cuadros de ictericia, hepatitis crónica en pacientes inmunodeprimidos o enfermedades agudas fulminantes, mostrando ratios de mortalidad mayores que la hepatitis A que pueden llegar al 20 % en mujeres embarazadas [204-206]. Actualmente, la infección causada por el HEV supone un importante problema de salud pública en muchas partes del mundo siendo responsable del 3,3 % de la mortandad provocada por hepatitis a nivel mundial. Aunque el virus se encuentra en todo el mundo, su impacto es mucho mayor en los países con menores recursos, por su menor acceso a agua y sistemas sanitarios [207].

La primera cepa de HEV animal se identificó en Estados Unidos en 1997 infectando a cerdos [208] y actualmente se sabe que está presente en todos los países del mundo. Desde ese momento, se han identificado varias cepas capaces de afectar a estos animales, así como en más de una docena de otras especies, entre las que se encuentran ciervos, camellos, conejos, roedores y aves [206]. Actualmente, la hepatitis E es reconocida como una enfermedad zoonótica emergente altamente prevalente en todo el mundo. No se conocen de forma segura todos los posibles hospedadores ya que en muchos casos genera una patología indetectable en los organismos infectados, lo que dificulta el desarrollo de sistemas de vigilancia efectivos [209].

El HEV pertenece al género *Orthohepevirus* dentro de la familia Hepeviridae, aunque el creciente número de cepas identificadas hace que la clasificación taxonómica sea muy cambiante. Su genoma está formado por una molécula sencilla de ARN (ARNss) de polaridad positiva. Este virus muestra la peculiaridad de ser capaz de aparecer tanto

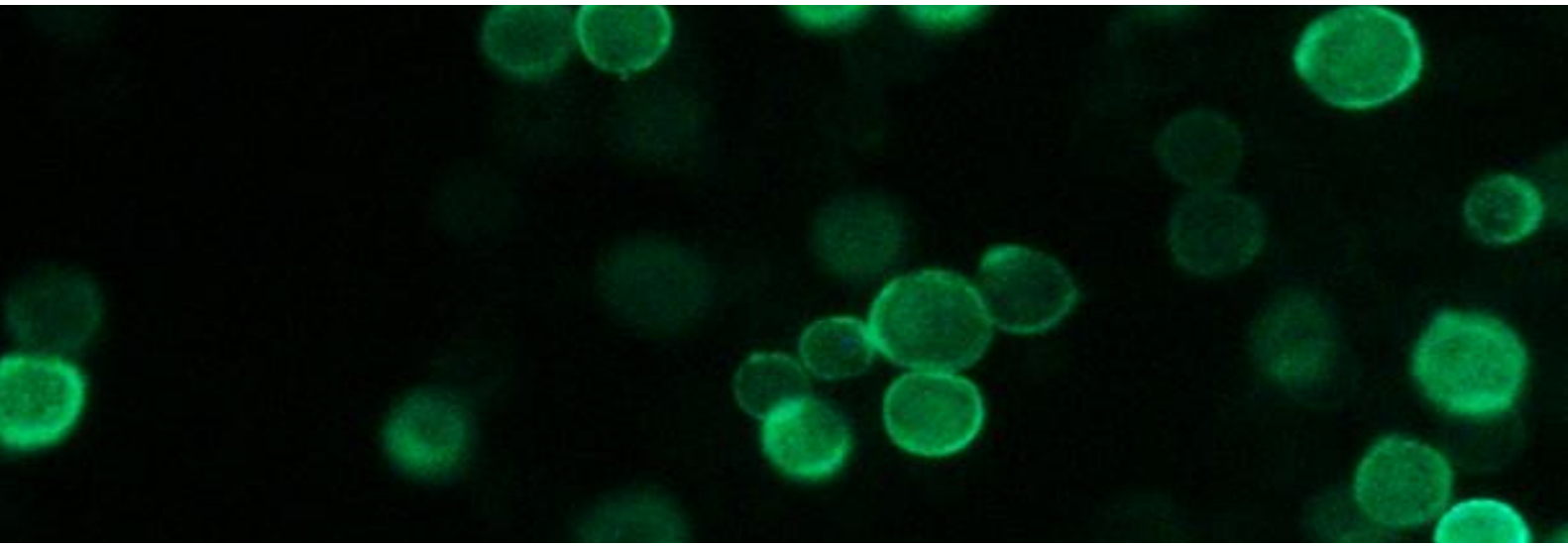
como virus envuelto de 27-30 nm de diámetro formado por una cápsida codificada por el marco de lectura 2 (ORF2) del virus, como asociado a lípidos y a la proteína codificada por el ORF3 formando una estructura cuasi-envuelta de unos 39 nm al circular por el torrente sanguíneo, lo que favorece la evasión del sistema inmune [205, 209, 210][Figura I.17].



**FIGURA I.17 | Virus de la hepatitis E.** A. Fotografía de microscopía electrónica mostrando las partículas no envueltas (flecha negra) y cuasi-envueltas (flechas vacías) de HEV. Esquema de la estructura de las partículas virales de HEV no envueltas (B) o cuasi-envueltas (C) [210, 211].

El análisis molecular del genoma de estos virus ha llevado a su clasificación en genotipos, entre los que los más relevantes son HEV1-4. Mientras que los genotipos HEV1 y HEV2 solo se transmiten entre humanos, los genotipos HEV3 y HEV4 se transmiten también de forma zoonótica desde reservorios animales. Los cerdos domésticos y jabalíes salvajes son los mayores reservorios de estas dos cepas virales, con una seroprevalencia que varía entre 23 % - 100 % [212]. Los análisis genéticos llevados a cabo dentro de la proteína de la cápsida (ORF2) han revelado una similitud entre los genotipos 1-4 del 85 % y se han identificado dentro de ella epítomos lineares y conformacionales [211], lo que la convierte en buena candidata para el desarrollo de ensayos diagnósticos.





# **OBJETIVOS**



## II. Objetivos

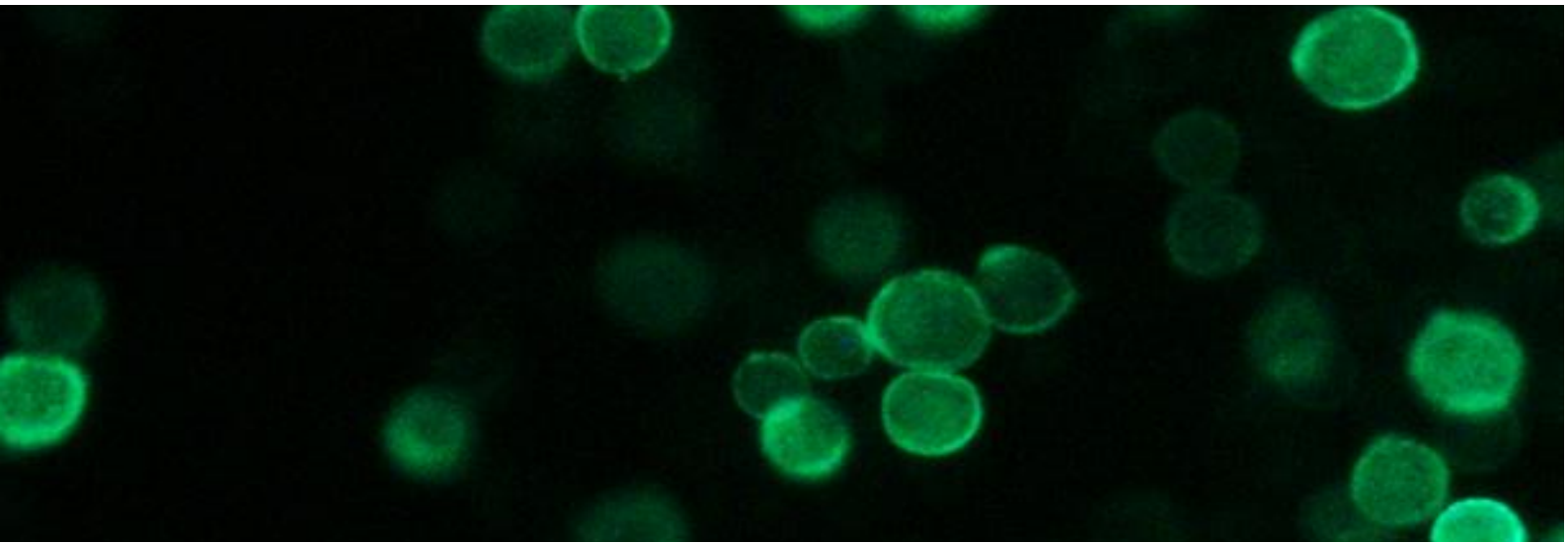
En un mundo con una elevada movilidad, interdependiente e interconectado, la transmisión de enfermedades infecciosas se ve facilitada, aumentando su velocidad de transmisión y, por tanto, convirtiéndolas en importantes amenazas, tanto para la salud pública como para la seguridad de las grandes explotaciones ganaderas. En concreto, para la industria porcina, las enfermedades infecciosas provocan unas elevadas pérdidas económicas a consecuencia tanto de su impacto directo, como de los costes indirectos que generan. Para tratar de minimizar este impacto, la vigilancia epidemiológica y la disponibilidad de métodos diagnósticos precisos son unas herramientas imprescindibles.

Así, el **objetivo principal** del presente trabajo de tesis es ampliar las herramientas disponibles y complementar las necesidades identificadas dentro del área diagnóstica para la industria porcina. Para ello, se ha acudido al diseño, puesta a punto y evaluación de nuevos ensayos de diagnóstico rápido y específico, que permitan la detección individual o conjunta de los principales patógenos de interés económico que afectan al ganado porcino, mediante métodos de diagnóstico directos e indirectos.

### **Objetivos específicos:**

1. Diseño, desarrollo y evaluación de ensayos basados en aptámeros para la detección directa de patógeno en muestras digestivas empleando como modelo el Rotavirus porcino tipo A.
2. Diseño, desarrollo y evaluación de ensayos basados en aptámeros para la detección directa de patógeno en muestras respiratorias, empleando como modelo los agentes causales que causan infección primaria en el complejo respiratorio porcino.
3. Obtención y caracterización de anticuerpos monoclonales para el diseño de métodos diagnósticos directos e indirectos empleando como modelo el virus de la peste porcina africana.
4. Diseño, desarrollo y validación de ensayos múltiples empleando la plataforma de microarray en suspensión, para la vigilancia de enfermedades de interés epidemiológico en el sector porcino.





# **MATERIALES Y MÉTODOS**



# III. Materiales y métodos

## III. 1. Materiales

### III. 1. 1 Virus

- Rotavirus Porcino tipo A (PRVA) obtenido de la Colección americana de cultivos tipo (ATCC, American Tissue Culture Collection), VR-893™.
- Circovirus porcino tipo 2 (PCV2) aislado PCV2/USA/MN-081/2007 (genotipo PCV2a).
- Influenza tipo A subtipo H1N1 cepa A/Puerto Rico/8/1934 proporcionado por la Dra. Amelia Nieto (Centro Nacional de Biotecnología (CNB), Madrid, España).
- Baculovirus parentales derivados del nucleopoliedrovirus múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV) en los que el gen de la poliedrina fue reemplazado con el gen *lacZ* que codifica la proteína  $\beta$ -galactosidasa (genoma BacPAK6). Así como baculovirus recombinantes derivados de esos parentales en los que el gen *lacZ* se reemplazó por el gen codificante de los antígenos de interés, realizando la selección en base a la capacidad de degradar X-Gal y generar coloración (clones no transformados) o no (clones transformados).

### III. 1. 2 Bacterias

Para la multiplicación y purificación de plásmidos modificados se emplearon las cepas de *Escherichia coli*:

- Mach1™-T1®. Genotipo: F<sup>-</sup>  $\phi$ 80(lacZ) $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 hsdR(rK - mK +)  $\Delta$ recA1398 endA1 tonA.
- DH5 $\alpha$ . Genotipo: F<sup>-</sup>  $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rK-, mK+) phoA supE44  $\lambda$ - thi-1 gyrA96 relA1.
- JM109. Genotipo: F' traD36, proAB, laqIqZ $\Delta$ M15 endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (rk-, mk+), relA1, supE44,  $\Delta$ ( lac-proAB).

Para la obtención de proteínas recombinantes, la cepa empleada de *E. coli* fue:

- BL21-AI, con genotipo: F<sup>-</sup> ompT hsdSB (rB<sup>-</sup>, mB<sup>-</sup>) gal dcm araB::T7RNAP-tetA.

### III. 1. 3 Líneas celulares

- Línea celular **Sf9**, establecida a partir de células de ovario, organismo *Spodoptera frugiperda*; clon 9 (ATCC<sup>®</sup> CRL-1711<sup>TM</sup>). Empleada para la obtención de baculovirus recombinantes y para la expresión de proteínas recombinantes de forma intracelular.
- Línea celular **Sf900**, variante de Sf9 adaptada al crecimiento en medio sin suero. Empleada para la expresión de proteínas recombinantes de forma extracelular.
- Línea celular **MA104**, establecida a partir de células epiteliales de riñón, organismo *Caercopithecus aethiops* de etapa embrionaria. Empleada para la amplificación del inóculo de PRVA.
- Línea celular **MDCK**, establecida a partir de células epiteliales de riñón, organismo *Canis familiaris*. Empleada para la amplificación del inóculo de Influenza A.
- Línea celular **VERO**, establecida a partir de células epiteliales de riñón, organismo *Caercopithecus aethiops* de etapa adulta. Empleada para la amplificación de PCV2
- Línea celular **Sp2/0-Ag14**, establecida a partir de células de hibridoma obtenidas de la fusión de un linfocito B y una célula de mieloma, no secretor de Ig, organismo *Mus musculus*. Empleada para la obtención de líneas de hibridoma.

### III. 1. 4 Animales de experimentación

En la obtención de anticuerpos monoclonales se emplearon hembras de ratones BALB/c de edad comprendida entre las 8 y 12 semanas.

### **III. 1. 5 Medios de cultivo**

#### **III. 1. 5. 1 Medios de cultivo para bacterias**

- Medio Luria-Bertani (LB) [213] preparado a partir de solución comercial (240210, DIFCO). Para la preparación de placas, se añadió bactoagar antes de la esterilización a una concentración final de 15 g/l. Tras la esterilización, se añadieron los antibióticos necesarios sobre el medio atemperado (40-50 °C) a 100 µg/ml de ampicilina (Amp) o 50 µg/ml de espectinomicina (Spc) según corresponda.
- Medio superóptimo con represión por catabolito S.O.C. (15544034, Invitrogen).

#### **III. 1. 5. 2 Medios de cultivo para células de insecto**

- Medio mínimo Grace (11605-086, Gibco) suplementado con suero fetal bovino al 5 % (v/v), plurónico P-68 al 0,2 % (p/v) y gentamicina a 50 µg/ml para el cultivo de células Sf9.
- Medio Sf-900<sup>TM</sup> II SFM 1X (10902-088, Gibco) suplementado con plurónico P-68 al 0,2 % (p/v) y gentamicina a 50 µg/ml para el cultivo de células Sf900.

#### **III. 1. 5. 3 Medios de cultivo para células de mamífero**

- Medio DMEM con 4,5 g/l glucosa y piruvato (41966-052, Gibco) suplementado con un 5% (v/v) suero fetal bovino descomplementado por incubación a 56 °C durante 30 min y antibióticos.
- Medio de crecimiento de virus: DMEN, 8 µg/ml tripsina pancreática bovina y antibióticos.
- Medio hibridoma: Hybridoma-SFM (12045-076, Gibco) suplementado con 5 % (v/v) suero fetal bovino descomplementado y antibióticos.
- Suplemento HAT 50X (21060017, Gibco)

### III. 1. 6 Anticuerpos monoclonales

Al inicio de esta tesis doctoral, en Ingenasa se disponía de una amplia batería de anticuerpos monoclonales frente a muchos de los patógenos estudiados en el presente trabajo. En la Tabla III.1 se recogen las características principales de todos los anticuerpos empleados.

**TABLA III.1** | Características principales de los AcMs empleados en el presente trabajo

| Patógeno                | Hibridoma/<br>Referencia | Casa<br>comercial | Isotipo           | Especificidad          |
|-------------------------|--------------------------|-------------------|-------------------|------------------------|
| PRRSV                   | <b>1AC7</b>              | Ingenasa          | IgG <sub>2a</sub> | N (PRRSV-I y PRRSV-II) |
| PCV2                    | <b>36A9</b>              | Ingenasa          | IgG <sub>2a</sub> | Cap                    |
|                         | <b>33H4</b>              | Ingenasa          | IgG1              | Cap                    |
| Influenza A             | <b>3DH6</b>              | Ingenasa          | IgG1              | NP                     |
|                         | <b>3CG5</b>              | Ingenasa          | IgG2b             | NP                     |
| <i>M. hyopneumoniae</i> | <b>1B9H1</b>             | Ingenasa          | IgG1              | P46                    |
|                         | <b>3G7H1</b>             | Ingenasa          | IgG1              | P46                    |
| PRVA                    | <b>1JF10</b>             | Ingenasa          | IgG2a             | VP6                    |
|                         | <b>1GH5</b>              | Ingenasa          | IgG2a             | VP6                    |
| <i>M. bovis</i>         | <b>83CA3</b>             | Ingenasa          | IgG1              | MPB83                  |
| ASFV                    | <b>17LD3</b>             | Ingenasa          | IgG2a             | VP72                   |
| CSFV                    | <b>14E11</b>             | Ingenasa          | IgG1              | E2                     |
| --                      | <b>1BH7</b>              | Ingenasa          | IgG1              | Fc IgG porcino         |
| --                      | <b>3H11</b>              | Ingenasa          | IgG1              | GST                    |
| --                      | <b>MA1-21315</b>         | Invitrogen        | IgG2b             | 6xHis                  |
| --                      | <b>SG253594</b>          | Sigma-Aldrich     | AcP-PA            | Anti-Fc ratón          |
| --                      | <b>A3562</b>             | Thermo-Fisher     | AcP-PO            | Anti-Fc ratón          |

\*PA, Fosfatasa alcalina. PO, Peroxidasa.

### III. 1. 7 Oligonucleótidos

#### III. 1. 7. 1 Cebadores específicos

Los oligonucleótidos que se emplearon como cebadores en la amplificación de los genes de interés se diseñaron en base a las secuencias codificantes de las distintas proteínas obtenidas de GenBank. La temperatura de anillamiento ( $T_m$ ) para la posterior reacción en cadena de la polimerasa se determinó en base a los cebadores diseñados (Tabla III.2). En cursiva se muestran las ediciones incorporadas para el proceso de clonaje de los genes (dianas de restricción) y subrayadas las ediciones para la expresión de las proteínas de interés (péptido de fusión de 6 histidinas, 6xHis).

| TABLA III.2   Cebadores específicos empleados en la PCR de los genes de interés |                            |  |   |
|---|----------------------------|--|---|
| Proteína<br>(Patógeno)  | Nº de acceso<br>de GenBank | Cebador directo  | Cebador inverso   |
| VP6<br>(PRVA)   | KR052760.1                 | 5'-ATG GAG GTT CTG TAC<br>TCA TTG TCA AAA-3'   | 5'-TTA TCA CTT AAT CAA<br>CAT GCT TCT AAT GGA<br>AGC TAC-3' |
| NP<br>(SIV)   | MH085233.1                 | 5'-ATG <u>CAC CAT CAC CAT</u><br><u>CAC CAT</u> GCG TCT CAA<br>GGC ACC AAA CGA TCA<br>TAT GAA-3' | 5'-TCA ACT GTC ATA CTC<br>CTC TGC ATT GTC TCC<br>GAA GAA-3' |
| Cap<br>(PCV2)   | KT868176.1                 | 5'- ATG ACG TAT CCA<br>AGG AGG CGT TAC CGC<br>AGA-3'   | 5'- TTA GGG TTT AAG TGG<br>GGG GTC TTT AAG-3'               |
| P46 ( <i>M. hyopneumoniae</i> )   | AY496280.1                 | 5'-ATG AAA AAA ATG CTC<br>CGT AAA AAA TTT CTC-3'   | 5'-ATT GAT GTT TTT ACC<br>CTG GAC-3'                        |
| VP30<br>(ASFV)  | MG596498.1                 | 5'-CGC <u>GGA TCC</u> ATG GAT<br>TTT ATT TTA AAT ATA<br>TC-3'                                    | 5'-CCG <u>CTC GAG</u> TTA AAA<br>CAT TAA ATG TAG GTG-3'     |

#### III. 1. 7. 2 Cebadores generales

**GW1.** 5'-GTTGCAACAAATTGATGAGCAATGC-3'

**GW2.** 5'- GTTGCAACAAATTGATGAGCAATTA-3'

**T7.** 5'- TAATACGACTCACTATAGGG-3'

**T7 reverso.** 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'

**M13.** 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'

**M13 reverso.** 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

**F3.** 5'-GCGGATGAAGACTGGTGT-3'

**R3.** 5'-GTTGCTCGTATTTAGGGC-3'

### III. 1. 8 Plásmidos

En la tabla III.3 se recogen las principales características de todos los plásmidos empleados para la expresión de los antígenos recombinantes de interés obtenidos.

**TABLA III.3 |** Características de los plásmidos de expresión empleados

| Plásmido     | Promotor   | Sistema expresión       | Expresión    | Péptido de fusión              |
|--------------|------------|-------------------------|--------------|--------------------------------|
| pDEST14      | T7         | <i>Escherichia coli</i> | Intracelular | Ninguno                        |
| pDEST15      | T7         | <i>Escherichia coli</i> | Intracelular | GST<br>(amino-terminal)        |
| pDEST17      | T7         | <i>Escherichia coli</i> | Intracelular | 6xHis<br>(amino-terminal)      |
| pET28a-SUMO  | T7         | <i>Escherichia coli</i> | Intracelular | SUMO-6xHis<br>(amino-terminal) |
| pAcHLTA/GW*  | Poliedrina | Baculovirus             | Intracelular | 6xHis<br>(amino-terminal)      |
| pBacPAK8/GW* | Poliedrina | Baculovirus             | Intracelular | Ninguno                        |
| pAcGP67/GW*  | Poliedrina | Baculovirus             | Extracelular | Ninguno                        |

\*Plásmidos modificados en Ingenasa con el casete de recombinación *in vitro* para su aplicación en el sistema Gateway.

### III. 1. 9 Aptámeros

Para la selección de aptámeros se partió de una biblioteca inicial de moléculas de ADN de 76 nt de longitud (RND40) obtenida de forma sintética. Estas moléculas constaban de dos regiones flanqueantes de secuencia conocida; F3 y R3, y una región de

40 nucleótidos centrales aleatoria: 5'-GCGGATGAAGACTGGTGT-(40N)-GCCCTAAATACGAGCAAC-3' (IBA Lifescience, Gotinga, Alemania). Los aptámeros marcados mediante distintas modificaciones (biotina o NH-C6) se obtuvieron por síntesis química de la casa comercial IBA.

Los aptámeros se estructuraron en PBS, 1 mM MgCl<sub>2</sub> mediante incubación durante 10 min en termobloque a 95 °C seguido de otros 10 min de incubación en hielo y, posteriormente, se mantuvieron a la temperatura de uso hasta su utilización.

### III. 1. 10 Reactivos, soluciones y tampones

En la tabla III.4 se recogen las especificaciones de los reactivos comerciales empleados en el presente trabajo.

**TABLA III.4 |** Reactivos comerciales empleados

| Nombre                                | Especificaciones  |
|---------------------------------------|---|
| ABTS                                  | Sustrato ABTS, Neogene (310177)   |
| Acrilamida                            | Las soluciones para la preparación de los geles de poli(acrilamida) fueron adquiridas a PanReac AppliChem |
| Inhibidores de proteasas              | Cóctel de inhibidores de proteasas cOmplete, Merck  |
| jetPEI®                               | Reactivo de transfección 101-10N, Polyplus  |
| Lisonasa                              | Lysonase™, Merck  |
| Microesferas magnéticas               | Microesferas MagPlex®, Luminex  |
| Resina de glutatión                   | GST GraviTrap, GE Healthcare  |
| Resina de níquel (Ni <sup>2+</sup> )  | His GraviTrap, GE Healthcare  |
| Resina de purificación de anticuerpos | rProtein A and rProtein G Sepharose 4 FF, GraviTrap Columns, GE Healthcare                                |
| Resina para inmovilización            | Sepharose 4 NHS fast flow, GE Healthcare  |
| Sarcosilo                             | lauroil sarcosinato de sodio, Sigma L5125-50G   |
| Tetrametil bencidina (TMB)            | Enhanced K-Blue® TMB Sustrato, Neogene  |
| Tripsina                              | Enzima TrypLE™ Express 1X, rojo fenol, Gibco 12605028   |

**TABLA III.5 | Soluciones y tampones**

| <b>Nombre</b>                         | <b>Especificaciones</b>   |
|---------------------------------------|---|
| Acetato sódico                        | Acetato sódico 3 M, pH 5,2  |
| Azul de Coomassie                     | 2,5 g/l de PhastaGel™ Bleu R en una solución 4,5:4,5:1 de agua:metanol:ácido acético  |
| Electrolito para SDS-PAGE             | 25 mM Tris, 192 mM Glicina, 1 % (p/v) SDS, pH 8,9   |
| PBS                                   | 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 7,4                                |
| PBST                                  | PBS suplementado con 0,05 % (v/v) Tween 20  |
| SciSPOT                               | Soluciones de plaqueo de AND sciSPOT Oligo B1 y sciSPOT Oligo B2, Scienion  |
| Solución de desteñido                 | Solución al 72:20:8 de agua:metanol:ácido acético   |
| Solución de tinción                   | PBS, rojo neutro y X-Gal  |
| Solución de transferencia             | 0,25 M Tris, 1,92 M Glicina   |
| Tampón borato                         | 50 mM Borato sódico, 50 mM NaCl, 1 % (v/v) Nonident P40, 0,5 % (v/v) deoxicolato sódico, 10 mM TCEP   |
| Tampón carbonato                      | 15 mM CO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub> , 35 mM CO <sub>3</sub> HNa, pH 9,6   |
| Tampón cloruro de guanidinio          | 50 mM Tris-HCl, 5 % (v/v) glicerol, 4 M Cloruro de guanidinio, pH 8,0   |
| Tampón de acoplamiento                | 0,2 M NaHCO <sub>3</sub> , 0,5 M NaCl, pH 8,3   |
| Tampón de almacenaje microesferas     | PBS, 1 % (p/v) BSA, 0,05 % (p/v) azida sódica   |
| Tampón de bloqueo inmunofluorescencia | PBS, 2,5 % (p/v) BSA, 0,1 % (v/v) Tween20, 10 % (v/v) suero de cabra  |
| Tampón de carga ácidos nucleicos (6X) | 0,25 % (p/v) azul de bromofenol, 40 % (p/v) sacarosa  |
| Tampón de carga proteínas (5X)        | 80 mM Tris-HCl (pH 6,8), 5 % (v/v) β-mercaptoetanol, 2 % (p/v) dodecil sulfato sódico (SDS), 10 % (v/v) glicerol, 0,01 % (p/v) azul de bromofenol |
| Tampón de diálisis fracción insoluble | 10 mM Tris HCl, 0,05 mM EDTA, 0,1 mM TCEP y 0,06% (v/v) sarcosilo, pH 8   |

| Tabla III.5 (continuación)   Soluciones y tampones |  |
|--|--|
| Nombre   | Especificaciones   |
| Tampón de diálisis purificación por AcM            | 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 8,8  |
| Tampón de ensayo                                   | PBS, 0,35 M NaCl, 0,05 % (v/v) Twen20, 0,05 % (v/v) Kathon   |
| Tampón de lavado ácido                             | 0,1 M Tris-HCl, pH 8,5   |
| Tampón de lavado básico                            | 0,1 M Acetato sódico, 0,5 M NaCl, pH 4,0   |
| Tampón de lavado ELISA                             | PBS, 135 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween20, 0,005 % (v/v) Kathon   |
| Tampón de lavado inmunofluorescencia               | PBS, 0,25 % (p/v) BSA, 0,1 % (v/v) Tween20   |
| Tampón de lavado fracción celular insoluble        | 50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 1 mM TCEP, 0,5 mM EDTA, 5 % (v/v) glicerol, 0,1 % (v/v) Tritón X-100, pH 8               |
| Tampón de resuspensión                             | 50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 1 mM TCEP, 0,5 mM EDTA, 5 % (v/v) glicerol, pH 8   |
| Tampón de urea                                     | 50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 1 % (v/v) Tritón X-100, 8 M Urea, 0,5 % (v/v) SDS, 1 mM $\beta$ -mercaptoetanol, pH 7,5 |
| Tampón NET   | 10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM MgSO <sub>4</sub> , pH 7,4   |
| Tampón TAE   | 40 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA, pH 8,4   |
| Tampón fosfatasa alcalina                          | 100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 9,5  |

**Consumibles:** Placas adherentes para cultivo celular (P100, T-25, T-75, T-150), CELLline (Sigma), placa de microtitulación NUNC A/S, placas de microtitulación Stripwell™ Microplate High Binding Polystyrene (Costar), placas de estreptavidina Pierce Streptavidin Coated Plates (ThermoFisher), Rapid DNA Ligation kit (Roche), SuperScript® One-Step RT-PCR with Platinum® Taq (Invitrogen™), AccuPrep® PCR Purification kit (Bioneer), AccuPrep® Gel Purification kit (Bioneer), pCR™8/GW/TOPO® TA Cloning® Kit (Invitrogen), PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen), Rapid DNA Ligation kit (Roche) y The Original TA Cloning kit (Invitrogen)

Los reactivos necesarios para la preparación de los tampones y soluciones descritos fueron adquiridos de las casas comerciales: Merck, Sigma y Panreac.

### III. 1. 11 Muestras biológicas

#### III. 1. 11. 1 Muestras digestivas porcinas

Para la evaluación del ensayo de detección de antígeno de Rotavirus porcino se emplearon 20 muestras de heces cedidas por el Centro de Investigación en Sanidad Animal IRTA-CReSA (Universidad Autónoma de Barcelona, España) previamente caracterizadas mediante RT-PCR como 10 positivas a PRVA y 10 negativas.

#### III. 1. 11. 2 Muestras del tracto respiratorio porcinas

Para la detección de antígeno de los principales agentes causantes del complejo respiratorio porcino, se trabajó con muestras de campo procedentes del Centro de Investigación en Sanidad Animal IRTA-CReSA (Universidad Autónoma de Barcelona, España) y del Centro Tecnológico Agroalimentario – Pozoblanco CICAP (Córdoba, España) previamente caracterizadas en dichos centros mediante RT-qPCR o qPCR. La caracterización de las muestras se recoge en la tabla III.6.

| TABLA III.6   Muestras porcinas de patógenos respiratorios |                         |                         |       |   |
|--|-------------------------|-------------------------|-------|---|
| Patógeno   | Positivas por (RT)-qPCR | Negativas por (RT)-qPCR | Total | Tipos de muestras   |
| SIV  | 118                     | 53                      | 171   | Hisopos nasales   |
| <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>                            | 144                     | 14                      | 158   | Hisopos traqueobronquiales y lavados broncoalveolares (BALF)                  |
| PCV2   | 36                      | 25                      | 61    | Sueros, hisopos traqueobronquiales y salivas                                  |
| PRRSV  | 179                     | 51                      | 230   | Sueros, hisopos traqueobronquiales, lavados broncoalveolares (BALF) y salivas |

### III. 1. 11. 3 Muestras de suero porcinas

Para todas las patologías ensayadas se disponía de sueros de referencia tanto positivos como negativos que se usaron en las primeras fases de la optimización de ensayos, recogidos en la siguiente tabla. Las muestras de suero empleadas en la optimización de los ensayos múltiples [Tabla III.7].

**TABLA III.7 | Características de las muestras de sueros porcinos**

| Patógeno      | Muestras positivas | Muestras negativas                     | Total | Origen de las muestras  | Ref.  |
|---------------|--------------------|--|-------|---|-------|
| ASFV          | 1                  |  |       | Suero de referencia ASFV. proporcionado por el laboratorio de referencia europeo de ASFV (EURL). Caracterizado por el ELISA de referencia de la OIE frente a la cepa BA71 |       |
|               | 185 + 11 dudosas   | 137                                    | 322   | Infección experimental. Instituto Pirbright, Pirbright, Reino Unido   | [214] |
|               | 13                 | 1                                      | 14    | Infección experimental. Instituto Friedrich-Loeffler (FLI), Greifswald, Alemania  |       |
| ASFV/<br>CSFV |                    | 253                                    | 253   | Granjas españolas libres de ASFV y CSFV   |       |
| CSFV          | 1                  |  |       | Suero de referencia CSFV. Centro de referencia de la FAO, FLI.  |       |
| CSFV          | 23                 | 6 (otros Pestivirus) +<br>1 (negativo) | 30    | Infección experimental. FLI   | [192] |
|               | 17                 | 29                                     | 46    | Infección experimental con varios <i>Pestivirus</i> que habitualmente exhiben reactividades cruzadas. FLI   |       |

**Tabla III.7 (continuación) | Características de las muestras de sueros porcinos**

| Patógeno        | Muestras clasificadas como positivas       | Muestras clasificadas como negativas | Total | Origen de las muestras   | Ref.  |
|-----------------|--|--------------------------------------|-------|--|-------|
| <i>M. bovis</i> | 1  |                                      |       | Suero de referencia <i>M. bovis</i> . Instituto superior de sanidad (Roma, Italia)       |       |
|                 | 30   | 76                                   | 106   | Cerdos Nebrodi criados en semilibertad. Instituto superior de sanidad (Roma, Italia)     |       |
|                 | 51 (cerdos) + 25 (rayones) + 30 (jabalíes) | 9 (cerdos) + 25 (jabalíes)           | 140   | Experimentales. Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (Ciudad Real, España) | [215] |
| PRRSV           | 1  |                                      |       | Mezcla de sueros obtenidos en infecciones experimentales a 94 días post-infección        |       |
|                 | 90   | 90                                   | 180   | Sueros porcinos de campo, campañas de vacunación. Laboratorio GSP (Lleida, España)       |       |
| HEV             | 1  |                                      |       | Suero porcino obtenido de campo. FLI   |       |
| Negativo        |  | 1                                    |       | Suero porcino comercial (Gibco, 26250084)  |       |
| Varios          | No caracterizado                           | No caracterizado                     | 941   | Cerdos de granjas alemanas. Instituto de virología diagnóstica, FLI                      |       |

## **III. 2. Métodos**

### **III. 2. 1 Manipulación de líneas celulares y virus**

#### **III. 2. 1. 1 Propagación de células de mamífero**

Las células MA104, MDCK, VERO y SP2 se cultivaron en adherencia empleando placas P100 estériles de plástico tratado y medio DMEN completo. Se añadieron 12 ml de una suspensión celular de baja densidad (aproximadamente  $1 \times 10^6$  células/ml, cel/ml) y las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera controlada de aire con un 8 % (v/v) de CO<sub>2</sub> hasta observar confluencia del 100 % por microscopía óptica. Las células se desprendieron por pipeteo o tripsinización (10 min incubación a 37 °C con tripsina) y los cultivos se amplificaron realizando una dilución 1:3 de las células contenidas en la placa confluyente en cada pase.

El almacenamiento de células se realizó resuspendiendo las células en su medio de crecimiento suplementado con un 10 % (v/v) de DMSO (dimetilsulfóxido). Las células se congelaron a -70 °C durante un mínimo de 16 h y, transcurrido ese tiempo, se pasaron a nitrógeno líquido, donde se mantuvieron durante largos periodos de tiempo.

#### **III. 2. 1. 2 Crecimiento de virus en cultivo celular**

El cultivo de virus animales se realizó sobre monocapa de células (MA104 para PRVA, MDCK para Influenza y VERO para PCV2). En primer lugar, se sembraron placas T-25 con 10 ml de células a una densidad de  $1 \times 10^6$  cel/ml en su medio de crecimiento y se incubaron toda la noche para alcanzar una confluencia del 100 %. A continuación, se retiró el medio y se añadieron 3 ml de medio de crecimiento de virus y 500 µl del inóculo viral descongelado en hielo. La infección se incubó 1 h, con agitación cada 10 min, a 37 °C y 8 % (v/v) CO<sub>2</sub> durante 1 h para la adsorción del virus. A continuación, se añadieron 5 ml de medio de crecimiento de virus y las infecciones se incubaron en las mismas condiciones hasta observar efecto citopático (lisis celular o formación de sincitios).

El inóculo se recogió tomando el contenido de las placas, sonicando en baño durante 5 min y clarificándolo por centrifugación a 200 *xg* y 4 °C durante 5 min. Seguidamente, se fue amplificando siguiendo este mismo protocolo ampliando el área de adhesión de las células por cultivo en placas T-75 y T-150. Los inóculos virales se almacenaron a -80 °C.

### **III. 2. 1. 3 Propagación de hibridomas**

Las líneas de hibridoma se crecieron en biorreactores CELLine. Los biorreactores se inocularon con  $30 \times 10^6$  células en un volumen final de 15 ml de medio de hibridoma. En la cavidad externa se añadieron 500 ml del mismo medio y se incubaron a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  y 5% (v/v)  $\text{CO}_2$ . El crecimiento se controló determinando la concentración de glucosa en la cavidad externa del biorreactor.

Para almacenar las nuevas líneas celulares, los cultivos se sedimentaron a baja velocidad ( $200\text{ }xg$ ), se resuspendieron en su medio de crecimiento suplementado con 10% (v/v) de DMSO a una concentración de  $1 \times 10^7$  cel/ml, se distribuyeron en alícuotas de 0,5-1 ml y se incubaron durante toda la noche a  $-70\text{ }^\circ\text{C}$ , tras lo cual se pasaron a  $\text{N}_2$  líquido y se mantuvieron en congelador isotérmico de nitrógeno líquido V3000-AB (Custom Biogenic Systems).

### **III. 2. 1. 4 Propagación de células de insecto**

Las células Sf9 se mantuvieron en cultivo continuo en suspensión con medio Grace. Mientras que las células Sf900 se incubaron en medio Sf-900. Ambas líneas celulares, se cultivaron a  $27\text{ }^\circ\text{C}$  y 125 rpm en agitador orbital hasta una densidad máxima de  $4 \times 10^6$  cel/ml.

## **III. 2. 2 Obtención y manejo de ácidos nucleicos**

### **III. 2. 2. 1 Extracción ARN a partir de inóculo viral**

Para la obtención del material genético de los virus de ARN se acudió a la extracción mediante disolventes orgánicos. Se añadieron 750  $\mu\text{l}$  de TRIzol® (ThermoFisher) por cada 100  $\mu\text{l}$  de muestra a extraer y a continuación se añadió cloroformo en una proporción 1:3. Las muestras se agitaron hasta su completa homogeneización y se incubaron 5 min a temperatura ambiente. Seguidamente se centrifugó a  $12.000\text{ }xg$  y  $4\text{ }^\circ\text{C}$  durante 15 min, recuperándose la fase acuosa. Esta fase acuosa se añadió sobre 500  $\mu\text{l}$  de isopropanol para precipitar el ARN y se incubó durante un mínimo de 10 min a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ . Los tubos se centrifugaron 10 min a  $12.000\text{ }xg$  y  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . Se decantó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 1 ml de etanol frío al 70%. Se centrifugó a  $12.000\text{ }xg$  y  $4\text{ }^\circ\text{C}$  durante 15 min recuperando el ARN en el sedimento. Por último, se decantó el sobrenadante y el sedimento se dejó secar durante 10 min antes de

resuspender el material extraído en 50 µl de agua libre de RNAsas. El material se conservó a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **III. 2. 2. 2 Extracción ADN a partir de inóculo viral**

El material a extraer se llevó a un volumen final de 500 µl con agua destilada. Se añadió el mismo volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico en una proporción 25:24:1 y se agitó la mezcla hasta su completa homogeneización. Se centrifugó a 10.000 *xg* durante 2 min y la fase acuosa se transfirió a un tubo limpio. Sobre la fase acuosa se añadieron 500 µl de cloroformo/alcohol isoamílico en una proporción 24:1 y se agitó la mezcla. Se repitió la centrifugación y el material se recuperó nuevamente en la fracción acuosa, a la que se añadieron 50 µl de acetato sódico 3 M pH 5,2. A esta mezcla se le añadió 1 ml de etanol absoluto y se incubó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 1 h. El ADN se precipitó a máxima velocidad en centrifuga durante 15 min y el sedimento se lavó con 500 µl de etanol al 70%. Se retiró el etanol, se secó el sedimento en Speedvac y seguidamente se resuspendió en agua milliQ estéril. El material se conservó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **III. 2. 2. 3 Retrotranscripción (RT)**

Para las reacciones RT-PCR, se empleó el kit SuperScript<sup>®</sup> One-Step RT-PCR with Platinum<sup>®</sup> Taq (Invitrogen<sup>™</sup>) que incorporaba Retrotranscriptasa y ADN polimerasa de alta fidelidad. La fase de retrotranscripción (RT) se llevó a cabo desnaturalizando las posibles estructuras secundarias del material genético ( $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 2 min) e incubando 30 min a  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Seguidamente, el ADNc se amplificó por PCR.

### **III. 2. 2. 4 Reacción en cadena de la polimerasa, PCR**

Para la amplificación de los genes de interés se utilizó una ADN polimerasa de alta fidelidad (Roche). Las mezclas de PCR se prepararon según las indicaciones del fabricante y se incubaron en termociclador. La temperatura de anillamiento ( $T_m$ ) se fijó en base a la pareja de cebadores empleada en la amplificación, como se describe en la tabla III.1. El tiempo de elongación ( $t_{\text{elong}}$ ) se determinó en base a la longitud del fragmento a amplificar de acuerdo con la procesividad de la ADN polimerasa empleada (1 min/1.000 pb). Las mezclas de PCR se sometieron a entre 25 y 30 ciclos de amplificación.

Los productos de PCR obtenidos se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa y se purificaron para su posterior clonaje. En caso de obtener una única banda tras la electroforesis, se eliminaron los cebadores no utilizados empleando el kit comercial AccuPrep<sup>®</sup> PCR Purification kit (Bioneer). En caso de obtenerse bandeo inespecífico, se separaron las bandas por electroforesis en gel de agarosa con bajo punto de fusión al 1% (p/v) y el producto de PCR se purificó a partir del gel empleando el AccuPrep<sup>®</sup> Gel Purification kit (Bioneer).

### **III. 2. 2. 5 Electroforesis en geles de agarosa**

La separación de las moléculas de ácido nucleico se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8-3% (p/v) según el tamaño del inserto en 0,5X TAE, conteniendo GelRed<sup>®</sup> (Biotium) según las indicaciones del fabricante. Como electrolito se empleó tampón 0,5X TAE. Las muestras se prepararon añadiendo 1/6 del volumen de la muestra de tampón de carga. Las condiciones de electroforesis (voltaje y tiempo) se adecuaron a las necesidades concretas de cada caso. Finalmente, los geles se fotografiaron en un transiluminador de radiación ultravioleta.

### **III. 2. 2. 6 Diseño de genes sintéticos**

Los genes sintéticos se diseñaron en base a las secuencias obtenidas de GeneBank de los genes codificantes de los antígenos de interés en cada caso. Las adaptaciones de los usos de codones se llevaron a cabo utilizando el software Codon Optimization Tool (Integrated DNA Technologies (IDT), Coralville, IOWA, EE. UU. Accesible en línea en: <https://eu.idtdna.com/pages/tools/codon-optimization-tool?returnurl=%2FCodonOpt>). Una vez optimizadas las secuencias, los genes fueron sintetizados por la casa comercial IDT.

### **III. 2. 2. 7 Secuenciación de ADN**

Todas las reacciones de secuenciación han sido realizadas por el Servicio de Secuenciación Automática de ADN del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) siguiendo el método de Sanger. La calidad de las secuencias se comprobó observando los cromatogramas en el software Chromas Lite 2.1 (Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Australia) y éstas se analizaron empleando el software Dsgene 1.5 (Accelrys, Inc., San Diego, California, EE.UU.).

### III. 2. 3 Construcción de plásmidos

#### III. 2. 3. 1 Plásmido de clonaje pCR<sup>TM</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup>

Los productos de PCR purificados se ligaron en primer lugar en un plásmido de clonaje, en fase con las regiones de recombinación del sistema Gateway (*attR* y *attL*) para facilitar el subclonaje a distintos vectores de expresión. La reacción de ligación se llevó a cabo con el pCR<sup>TM</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup> TA Cloning<sup>®</sup> Kit (Invitrogen) por extremos cohesivos debido a la presencia de bases libres en los extremos del vector lineal. La mezcla de ligación se preparó siguiendo las indicaciones del fabricante y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente para obtener los productos de ligación.

#### III. 2. 3. 2 Producción de plásmidos

Las distintas mezclas de ligación se emplearon para transformar células químicamente competentes de *E. coli* Mach1 (para plásmidos pTOPO) y DH5 $\alpha$  (para el resto de plásmidos), siguiendo el protocolo descrito en el apartado III.2.4.2. Se realizó la selección de clones por PCR (III.2.4.3) y dos colonias positivas aisladas se inocularon en 10 ml de LB-Spc (pCR<sup>TM</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup>) o LB-Amp (resto de plásmidos), que se incubaron durante toda la noche a 37 °C y 225 rpm. A partir de 5 ml de ese cultivo se purificó el plásmido mediante el método comercial PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen). Tras la purificación, el plásmido se cuantificó mediante NanoDrop y la secuencia del inserto se comprobó mediante secuenciación.

#### III. 2. 3. 3 Plásmidos de expresión. Sistema Gateway

El paso del plásmido de clonaje a los plásmidos de expresión o transferencia se realizó a través de reacciones de recombinación *in vitro*, para lo cual se utilizó la LR Clonase<sup>®</sup> II enzyme mix (Invitrogen). Las mezclas de ligación se prepararon siguiendo las indicaciones del fabricante, añadiendo 150 ng de plásmido de clonaje con el inserto y 150 ng de plásmido de expresión o transferencia y se incubó 1 h a temperatura ambiente. A continuación, se añadió 1  $\mu$ l de proteinasa K y se incubó 10 min a 37 °C para obtener los productos finales de ligación.

### **III. 2. 3. 4 Plásmido de expresión pET28A-SUMO**

El gen codificante de la proteína VP30 del virus de la peste porcina africana se modificó mediante PCR. Se insertaron las secuencias para el corte por las enzimas de restricción BamHI y XhoI en el extremo 5' y 3' respectivamente, incorporando secuencias flanqueantes que favorecieran el corte por las endonucleasas (Tabla III.2).

El producto de PCR purificado y el plásmido pET28A-SUMO se digirieron por separado con las enzimas de restricción seleccionadas de forma secuencial. La ligación se llevó a cabo con el Rapid DNA Ligation kit (Roche) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se añadieron 100 ng del fragmento de PCR y 100 ng de plásmido, ambos digeridos, y se incubó 15 min a temperatura ambiente obteniendo los productos de ligación. Los plásmidos se obtuvieron siguiendo el protocolo descrito en el apartado III.2.3.2.

## **III. 2. 4 Manipulación de bacterias**

### **III. 2. 4. 1 Mantenimiento y crecimiento de *E. coli***

Todas las cepas bacterianas se crecieron a 37 °C en medio LB suplementado con el antibiótico necesario y 225 rpm, en el caso de trabajar con medios líquidos, o sin agitación al trabajar en placa. Para mantener los clones, se prepararon alícuotas en el mismo medio de crecimiento suplementado con glicerol al 20% (v/v) que se conservaron a -80°C.

### **III. 2. 4. 2 Transformación de *E. coli***

Para la transformación de las bacterias, se utilizaron células químicamente competentes comerciales de las distintas cepas descritas en el apartado III.1.2. Las células comerciales se descongelaron en hielo para conseguir la máxima eficiencia de transformación. En primer lugar, se incubaron 30 min en hielo en presencia del ADN plasmídico a transformar, se añadieron 2-4 µl de mezcla de ligación o 10 ng de plásmido purificado por transformación. Se aplicó un tratamiento de choque térmico por incubación 30-40 s a 42 °C en baño y a continuación, 2 min en hielo. Tras el choque térmico, las bacterias se multiplicaron añadiendo 250-400 µl de medio súper óptimo con represión de catabolitos (S.O.C.) y se incubaron 30-60 min en las condiciones descritas anteriormente. Tras este periodo, las células se expandieron en placas de LB selectivas, con el antibiótico

al que confería resistencia el plásmido transformado, y se incubaron a 37 °C durante toda la noche para permitir el crecimiento de colonias aisladas.

### **III. 2. 4. 3 Selección de clones por PCR**

Para comprobar la presencia de inserto en la orientación correcta en las bacterias transformadas, se procedió al análisis de las colonias crecidas mediante PCR. Para ello, se preparó una mezcla de PCR siguiendo el protocolo descrito en el apartado III.2.2.4. Como cebadores se añadieron un cebador general del plásmido hacia el extremo 5' del sitio de iniciación del gen de interés, y el oligonucleótido complementario del extremo 3' (carboxilo-terminal) del gen. Se tomó la colonia a analizar, se estrió en una placa nueva de LB selectiva para obtener una réplica, y se añadió como molde a la mezcla de PCR. Los productos de PCR se separaron en electroforesis en geles de agarosa. La presencia de producto de PCR indicó que el plásmido contenía el gen de interés en la orientación adecuada para el subclonaje (clon positivo).

### **III. 2. 4. 4 Selección de condiciones óptimas para la expresión en bacteria**

Una colonia aislada de *E coli*. BL21-AI transformada se inoculó en 10 ml de LB-Amp y se incubó a 37 °C y 225 rpm toda la noche. Empleando 2 ml de ese preinóculo, se inocularon 100 ml de LB-Amp para obtener una densidad óptica a 600 nm (DO<sub>600</sub>) inicial de 0,05-0,1. El cultivo se incubó en las mismas condiciones hasta que se alcanzó una DO<sub>600</sub> de entre 0,4-0,8 correspondiente con la fase exponencial de crecimiento. En ese momento, se añadió un 1 ml de arabinosa al 20% (p/v) estéril para inducir la expresión de la T7 polimerasa (genoma bacteriano) y, con ella, la expresión del gen de interés.

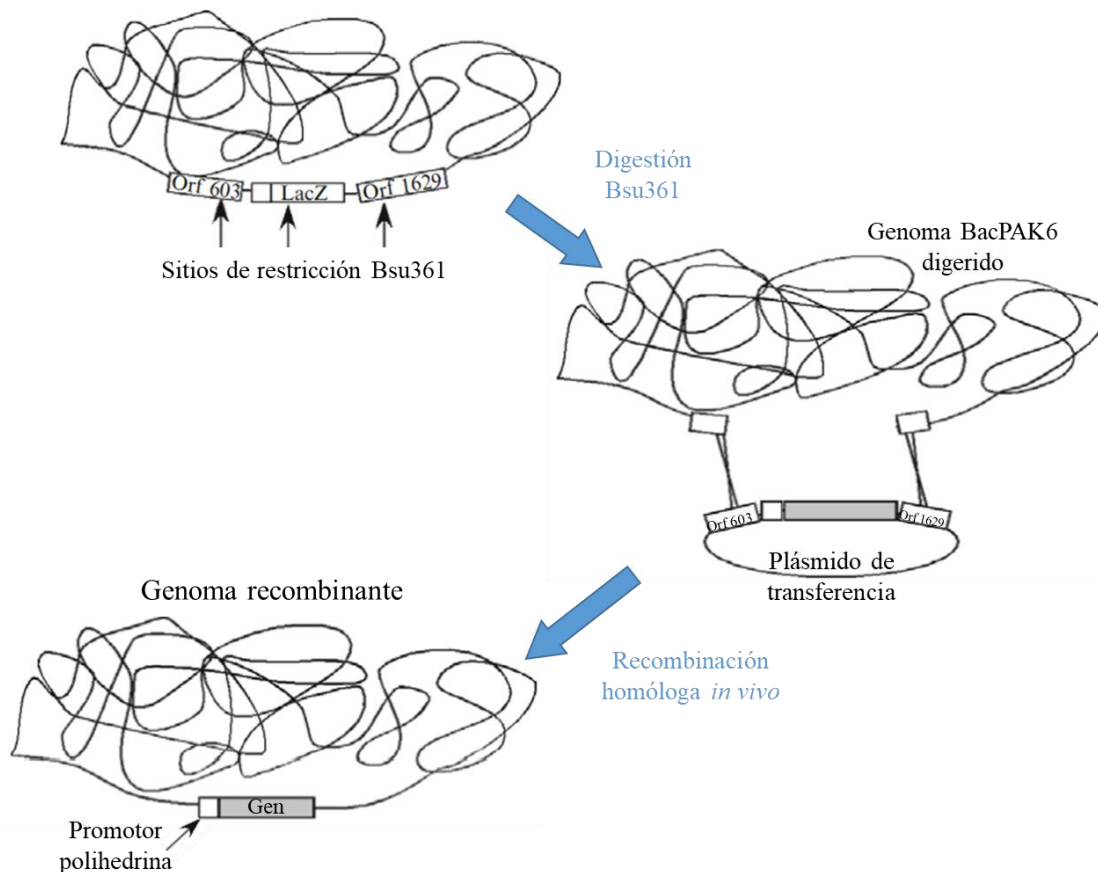
Para determinar el punto de producción máxima de la proteína recombinante se realizó una cinética de expresión recolectando muestras de 1 ml del cultivo post-inducción cada hora, hasta la recogida de la quinta hora post-inducción. La producción de la proteína de interés se evaluó directamente en las fracciones totales recogidas por electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE, apartado III.2.6.2) y posterior tinción con azul de Coomassie (III.2.6.3) e inmunodetección en membranas de nitrocelulosa (III.2.6.5).

Una vez determinadas las condiciones óptimas se inoculó un cultivo de 100 ml de LB-Amp y se indujo la expresión de la proteína recombinante en las mismas condiciones. El cultivo se cosechó al tiempo establecido por cinética centrifugando a 10.000  $\times g$  y 4 °C durante 15 min y el sedimento se procesó para purificar la proteína a partir de él.

### III. 2. 5 Manipulación de baculovirus

#### III. 2. 5. 1 Obtención de baculovirus recombinantes

Los baculovirus recombinantes se obtuvieron siguiendo el protocolo descrito por Hurtado *et al.* [216], por cotransfección del plásmido de transferencia que contenía el gen de interés y el ADN de baculovirus (BacPAK6) digerido con la enzima de restricción Bsu361, introduciendo el gen de interés entre el ORF603 y el ORF1629 del genoma, eliminando el gen lacZ [Figura III.1].



**FIGURA III.1 | Transferencia *in vivo* de genes al genoma de baculovirus BacPAK6.** Esquema de la recombinación homóloga que ocurre en células Sf9 entre el ORF603 y el ORF1629, presentes tanto en el genoma BacPAK6, como en las regiones flanqueantes de los vectores de transferencia del sistema BVES. Adaptada de Jarvis, 2009 [217].

Brevemente, la cotransfección se llevó a cabo en células Sf9 en presencia de cationes lipídicos (Sistema jetPEI®) siguiendo las indicaciones del fabricante. La mezcla se incubó durante 30 min a temperatura ambiente y se añadió sobre placas T-25 adherentes sembradas con  $2 \times 10^6$  células Sf9 y 1,5 ml de medio Grace completo. Las placas se incubaron durante 5 h a 27 °C agitando ocasionalmente y, tras ese tiempo, se eliminó la mezcla de transfección y se añadieron 5 ml de medio Grace completo. Las placas se incubaron a 27 °C hasta observar efecto citopático (7 días aprox.). A continuación, se recogió el medio de cultivo de las placas y los virus se aislaron siguiendo el protocolo descrito en el apartado III.2.5.2.

### **III. 2. 5. 2 Aislamiento de clones de baculovirus**

En primer lugar, se sembraron placas adherentes M6 con  $1,2 \times 10^6$  células Sf9/pocillo y sobre cada pocillo se añadieron 200  $\mu$ l de diluciones seriadas (desde  $10^{-3}$  a  $10^{-7}$ ) del material a titular. Las placas se incubaron durante 1 h a 27 °C con agitación cada 15 min. Seguidamente se retiró la solución que contenía el virus y se añadieron 2 ml de una mezcla de agarosa de bajo punto de fusión al 3% (p/v) con medio Grace completo en proporción 1:1. Se dejó solidificar a 27 °C, se añadió 1 ml de medio Grace completo por encima del agar y se incubó durante 5-6 días a 27 °C.

Transcurrido el tiempo de incubación, se retiró el medio líquido y se añadieron 2 ml/pocillo de solución de tinción, que se incubó durante 1 h a 27 °C. Transcurrido ese tiempo, se retiró la mezcla y la placa se incubó a 4 °C durante toda la noche. El número de placas de lisis en una determinada dilución dio el título del inóculo:

$$\text{Título (unidades formadoras de placa (ufp)/ml)} = \frac{n^{\circ} \text{ de placas de lisis} \times \text{Dilución}}{200}$$

Para obtener clones aislados, se aspiró con pipeta Pasteur la agarosa de 5 placas de lisis que se observaban blancas, ya que en la recombinación se elimina el gen *lacZ* que codifica la  $\beta$ -galactosidasa (ver apartado III.1.1.). El agar se resuspendió en 500  $\mu$ l de medio Grace completo y se incubó a 4 °C durante toda la noche para permitir la liberación del virus.

### **III. 2. 5. 3 Selección de baculovirus recombinantes**

Para evaluar la producción de la proteína de interés, se sembraron placas adherentes P-60 con  $2 \times 10^6$  células Sf9/placa, se añadieron 150  $\mu$ l de los clones aislados de Baculovirus en un volumen final de 500  $\mu$ l de medio Grace completo y se incubaron a 27 °C durante 1 h con agitación cada 15 min. Transcurrido ese tiempo, se añadieron 4,5 ml de medio Grace completo por placa y se incubaron a 27 °C durante 5-6 días. Las células se recogieron resuspendiendo las células adheridas con pipeta y centrifugando a 2.000  $xg$  y 4 °C durante 10 min. El sobrenadante se conservó a 4 °C como inóculo primario mientras que el sedimento se procesó para evaluar la expresión de proteínas.

### **III. 2. 5. 4 Propagación de baculovirus**

Los inóculos de alto título viral se obtuvieron infectando 100 ml de células Sf9 a una densidad de  $1 \times 10^6$  cel/ml con 100  $\mu$ l del inóculo primario obtenido en la selección de clones o de un inóculo antiguo (baja multiplicidad de infección). Los cultivos se incubaron a 27 °C y 125 rpm hasta observar muerte celular por microscopía óptica (10 días aprox.) y el inóculo se recogió centrifugando a 2.000  $xg$  y 4 °C durante 10 min para eliminar los restos celulares. El título del inóculo viral se determinó como se detalla en el apartado III.2.3.2.

### **III. 2. 5. 5 Selección de condiciones óptimas para la expresión en células de insecto**

En primer lugar, se realizó una cinética de expresión de la proteína de interés, para lo cual se infectaron cultivos de 50 ml a una densidad de  $1 \times 10^6$  cel/ml de células Sf9 (AcHLTA o AcBacPAK8) o Sf900 (AcGP67). Los cultivos se infectaron a distintas multiplicidades de infección (MDI; ufp/cel) partiendo del inóculo titulado y se incubaron a 27 °C y 125 rpm, recogiendo muestras de 15 ml a las 72, 96 y 120 h post-infección. Las muestras se procesaron como se describe en el apartado III.2.6.1.

De esta forma, se determinaron las mejores condiciones de MDI y tiempo de recogida para la expresión de la proteína de interés que fueron las que se emplearon posteriormente en cultivos de mayor volumen.

## III. 2. 6 Preparación y análisis de extractos proteicos

### III. 2. 6. 1 Obtención de extractos proteicos de células de insecto

Las células Sf9 o Sf900 se lisaron mediante choque hipotónico con tampón bicarbonato 25 mM: se añadió 1 ml de tampón por cada  $2 \times 10^7$  cel y se incubaron durante 30 min en hielo. A continuación, las células se sonicaron a potencia 40 en sonicador 3000MP (BioLogics Inc.) durante 30 s y el lisado se centrifugó a  $10.000 \times g$  para separar fracción soluble (sobrenadante) e insoluble (sedimento), ésta última se resuspendió en el mismo volumen de PBS estéril. Ambas fracciones se evaluaron mediante PAGE-SDS y posterior tinción con azul de Coomassie y *western blot*.

### III. 2. 6. 2 Electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

Los geles de poliacrilamida se prepararon según las indicaciones del productor a una concentración de acrilamida de entre el 10 y el 12 %. Las muestras a analizar se prepararon añadiendo 1/5 de su volumen de tampón de carga para SDS-PAGE y las proteínas se desnaturizaron por incubación a 100 °C durante 5 min. A continuación, se añadieron sobre los pocillos y se resolvieron por electroforesis en geles de poliacrilamida. Las condiciones de tiempo y voltaje se adecuaron a cada uno de los ensayos. Como marcador de peso molecular se empleó el marcador de color dual de 10 a 250 kDa Dual Color Standard (1610374, Bio-Rad).

### III. 2. 6. 3 Tinción con azul de Coomassie

Tras separar las proteínas por SDS-PAGE, los geles se tiñeron durante 30 min a temperatura ambiente en agitación con azul de Coomassie. Seguidamente se eliminó la solución de tinción y se realizó el desteñido diferencial incubando los geles a temperatura ambiente con agitación y solución de desteñido.

### III. 2. 6. 4 Tinción de ácido periódico-Schiff (PAS)

Para teñir únicamente las proteínas glicosiladas, tras separar las proteínas por SDS-PAGE, los geles se incubaron durante 30 min con ácido acético 7,5 % (v/v) en agitación. A continuación, se eliminó la solución y se añadió ácido periódico 0,2 % (p/v) que se incubó 1 h a 4 °C con agitación. Los geles se transfirieron a una cubeta con reactivo

de Schiff y se incubaron durante otra hora a 4 °C con agitación. Para terminar, los geles se incubaron 1 h a temperatura ambiente con ácido acético 7,5 % (v/v) y se conservaron en agua antes de secarlos.

### **III. 2. 6. 5 Inmunodetección en membranas de nitrocelulosa (*western blot*)**

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfirieron del gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa. Para ello, el gel se incubó durante 10 min en tampón de transferencia y, seguidamente, se colocó sobre una membrana de nitrocelulosa de 0,2 µm de tamaño de poro (Bio-Rad, 1620112) en un sándwich con papeles 3MM (GE Healthcare, 3030-917) humedecidos en ese mismo tampón sobre Trans-Blot® Turbo™ (Bio-Rad). Se aplicó un potencial de 25 V y 2,5 A durante 10 min para la transferencia. La membrana se bloqueó durante 30 min a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C con PBS, leche 5 % (p/v). Se lavó con PBS-Tween20 0,05 % (v/v) y se incubó 1 h con el monoclonal específico de la proteína de interés a una concentración de entre 10 y 1 µg/ml en PBST (en algunos casos suplementado con leche al 3% para evitar uniones inespecíficas). Seguidamente, la membrana se lavó 3 veces durante 5 min con PBST, y se incubó 1 h con un anti-IgG de ratón marcado con fosfatasa alcalina (Sigma Aldrich) a la dilución indicada por la casa comercial. Se repitieron los lavados y se reveló con tampón fosfatasa alcalina (añadiendo Cloruro de nitroazul de tetrazolio (NBT) y 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP)).

### **III. 2. 6. 6 Microscopía electrónica**

Las fotografías de microscopía electrónica se obtuvieron en el Centro Nacional de Biotecnología (CNB) tras tratar las muestras por tinción negativa.

## **III. 2. 7 Purificación de proteínas**

### **III. 2. 7. 1 Purificación a partir de la fracción insoluble de las células**

En primer lugar, se procedió a purificar la fracción celular insoluble de los cultivos obtenidos en condiciones óptimas. Las células se resuspendieron en 10 ml/g<sub>sedimento</sub> de tampón de resuspensión y, en caso de trabajar con bacterias, se añadieron 20 µl/g<sub>sedimento</sub> de lisonasa. Los tubos se incubaron en agitación durante 15 min a temperatura ambiente en balancín y a continuación las células se lisaron mediante sonicación. Se añadió Tritón X-100 a una concentración final del 1 % (v/v) y se incubó 15 min en las mismas condiciones para la completa homogeneización.

El lisado celular se centrifugó a 7.000 *xg* y 10 °C durante 15 min para recuperar la fracción insoluble, que se lavó dos veces con tampón de lavado de fracción celular insoluble para eliminar las proteínas contaminantes y otras dos veces con tampón de resuspensión para eliminar los restos de Tritón X-100.

Una vez purificada la fracción insoluble se procedió a su solubilización mediante diversos protocolos.

#### **III. 2. 7. 1. 1 Solubilización mediante sarcosilo**

Para ello, el sedimento obtenido tras los lavados se resuspendió en 10 ml de tampón de desnaturalización cada 0,5 g de sedimento. La suspensión se sonicó en hielo durante 30 s y se añadió sarcosilo a una concentración final de 5,25 % (v/v), se incubó con agitación en balancín a temperatura ambiente hasta la completa solubilización y, a continuación, se dializó durante toda la noche a 4 °C frente a tampón de diálisis. Las fases recogidas durante el proceso se analizaron mediante SDS-PAGE y posterior tinción con azul de Coomassie y *western blot*.

#### **III. 2. 7. 1. 2 Solubilización mediante cloruro de guanidinio**

La fracción celular insoluble se resuspendió en 1 ml de tampón cloruro de guanidinio por cada 0,5 g de sedimento y se incubó en balancín 5 min a temperatura ambiente. Seguidamente, la suspensión se centrifugó a 12.000 *xg* durante 10 min y las fracciones obtenidas se evaluaron mediante SDS-PAGE y posterior tinción con azul de Coomassie y *western blot*.

### **III. 2. 7. 1. 3 Solubilización mediante urea**

La fracción insoluble se resuspendió en tampón de urea añadiendo 2,5 ml por cada 0,5 g de sedimento, se sonicó 4 veces en hielo aplicando ciclos de 30 s de sonicación a potencia 40 seguidos de 30 s de incubación en hielo. Seguidamente, el homogeneizado se centrifugó a 10.000  $xg$  durante 10 min a 4 °C y se descartó el sedimento, la proteína se recuperó en la fracción soluble (sobrenadante). Las fases finales del proceso de solubilización se analizaron mediante SDS-PAGE y posterior tinción con azul de Coomassie y *western blot*.

### **III. 2. 7. 2 Purificación por columnas de afinidad**

La purificación mediante columnas de afinidad se llevó a cabo usando las columnas comerciales empaquetadas de acuerdo con el péptido de fusión de la proteína o con anticuerpos monoclonales.

#### **III. 2. 7. 2. 1 Purificación a partir de péptidos de fusión**

En el caso de proteínas fusionadas a GST se utilizaron resinas de glutatión mientras que para columnas fusionadas al péptido 6xHis se usaron resinas de  $Ni^{2+}$ . En ambos casos, la columna se equilibró con PBS. Se añadió la fracción soluble que contenía la proteína recombinante a la columna y se lavó con 10 ml de PBS (en el caso de purificar a partir del péptido de fusión 6xHis, se le añadió 10 mM de imidazol al lavado para evitar uniones inespecíficas). Tras el lavado se eluyó la proteína retenida con 3 ml de PBS suplementado con 10 mM Glutatión (GST) o 500 mM imidazol (6xHis) repitiendo el proceso de elución 3 veces (eluido 1, eluido 2 y eluido 3).

#### **III. 2. 7. 2. 2 Purificación mediante AcMs**

En primer lugar, se procedió a la inmovilización del anticuerpo monoclonal a una resina para su posterior empaquetado. Para ello, 8 mg de anticuerpo a inmovilizar se dializaron durante toda la noche a 4 °C frente a tampón de acoplamiento. Tras recoger la diálisis se determinó la concentración mediante Nanodrop y se diluyó en ese mismo tampón a una concentración final de 1,6 mg/ml. A continuación, se tomaron 6 ml de la suspensión de resina sefarosa 4 NHS fast flow (GE), se eliminó el isopropanol centrifugando a 2.500  $xg$  y 4 °C durante 3 min y se realizaron tres lavados con 5 ml de HCl 1 mM y un cuarto lavado con tampón de acoplamiento. Se añadieron los 5 ml

(aproximadamente) de anticuerpo y se incubó en agitador rotatorio tipo noria durante 30 min a temperatura ambiente. Se añadieron otros 5 ml de tampón de acoplamiento y la suspensión se incubó en agitación a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente la suspensión de resina:anticuerpo se centrifugó a 1.500  $xg$  y 4 °C durante 3 min, se añadieron sobre el sedimento 5 ml de tampón de bloqueo y se incubó 2 h a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo la resina se recuperó por centrifugación a 1.500  $xg$  y 4 °C durante 3 min y se realizó un lavado con 5 ml de tampón de lavado básico y otro con 5 ml de tampón de lavado ácido centrifugando entre medias para recuperar la resina. Esta última etapa de lavado se repitió entre 4 y 6 veces, y, por último, se realizaron 5 lavados con 5 ml de PBS. La resina se conservó a 4 °C en tampón de acoplamiento suplementado con etanol al 20% hasta su uso.

La resina acoplada se equilibró con PBS, se añadió la fracción soluble que contenía la proteína y se incubó en balancín durante toda la noche a 4 °C. La resina se empaquetó en una columna para la purificación de la proteína recombinante. Se lavó con 300 ml de PBS para eliminar uniones inespecíficas y se procedió a eluir la proteína, añadiendo 10 ml de tampón de elución (Glicina 0,1 M). El eluido se recogió en fracciones de aproximadamente 1,5 ml. Los distintos eluidos se dializaron durante toda la noche a 4 °C frente a tampón de diálisis y se evaluaron mediante SDS-PAGE y posterior tinción con azul de Coomassie y *western blot*.

### **III. 2. 7. 3 Purificación por ultracentrifugación**

La fracción celular insoluble de las células Sf9 correspondiente a  $1 \times 10^8$  cel se resuspendió en 25 ml de tampón borato y se incubó durante la noche a 4 °C. Al día siguiente la solución se colocó sobre 4 ml de una solución de sacarosa al 40 % (p/v) (colchón de sacarosa) en PBS. El colchón se sometió a ultracentrifugación durante 1 h a 30.000  $xg$  en rotor Ti-70 (pelletier scolchoni, Bechmen COULTER), se decantó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 8 ml de tampón NET. La suspensión se sometió a un pulso de sonicación y, seguidamente, se centrifugó durante 2 min a 12.000  $xg$ . El sedimento se resuspendió en 1 ml de PBS y ambas fracciones se evaluaron por SDS-PAGE y posterior tinción con azul de Coomassie y *western blot*.

## **III. 2. 8 Obtención de anticuerpos monoclonales**

### **III. 2. 8. 1 Inmunización de ratones BALB/c**

En primer lugar, se preparó una emulsión 1:1 de la proteína de interés con adyuvante completo de Freund (F5506, Sigma) por sonicación y se suministraron 30 µg de antígeno emulsionado por vía intraperitoneal a los animales. A los 15, 30 y 45 días de esta primera inmunización, se repitió el proceso preparando la emulsión con adyuvante incompleto de Freund (F5881, Sigma), añadiendo la misma dosis de antígeno.

Transcurrida una semana de la última dosis, se sangró a los ratones de la vena caudal. La sangre se incubó 30 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 8.000  $\times$ g durante 5 min para obtener el suero. Los sueros obtenidos se valoraron en ELISA indirecto frente a 200 ng/pocillo de la proteína de interés (apartado III.2.10.1.1.). Cuando el límite de detección obtenido fue igual o mayor a la dilución 1/128.000, se procedió a realizar la fusión celular para la obtención de hibridomas. En caso contrario, se continuó el proceso de inmunización con otras dos dosis en adyuvante incompleto.

### **III. 2. 8. 2 Fusión celular. Obtención de hibridomas**

En cada uno de los tres días anteriores al procedimiento, se suministró a los animales una dosis de 30 µg de antígeno diluido en PBS estéril. El día del procedimiento, los dos animales de mayor título fueron sacrificados y se les extrajo el bazo, rompiendo sus estructuras para extraer los linfocitos.

Tanto la preparación de las células para la fusión (células de mieloma de ratón (SP2) y células de bazo de los ratones inmunizados) como la fusión de los dos tipos celulares purificados se realizó siguiendo el protocolo descrito por Nowinski y col. (1979) [77]. Las células resultantes de la fusión se sembraron en placas de 96 pocillos adherentes añadiendo 100 µl/pocillo de una suspensión a  $10^7$  células/ml con DMEM, 15% (v/v) suero fetal bovino. A las 24 h, se añadieron 100 µl/pocillo de medio DMEM suplementado con HAT (0,2 mM Hipoxantina, 0,8 µM Aminopterina y 32 µM Timidina) y las placas se incubaron a 37 °C y 5 % (v/v) CO<sub>2</sub>. Cada 2 días aproximadamente se reemplazó el medio con medio de hibridomas.

La composición del medio HAT inhibe la síntesis de bases nitrogenadas por la ruta de síntesis *de novo* (metabolismo de células de mieloma) a través de la aminopterina y

aporta los precursores para la síntesis de bases nitrogenadas por la ruta de salvamento: hipoxantina y timidina (metabolismo de linfocitos), de modo que las únicas células que pueden desarrollarse son aquellas formadas por la fusión de un linfocito y una célula de mieloma, que son aquellas células inmortales capaces de desarrollarse [Figura III.2].

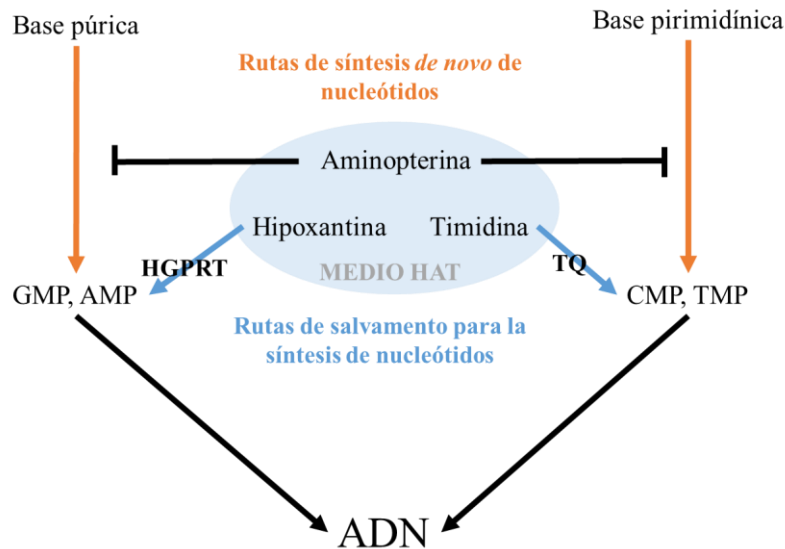


FIGURA III.2 | Esquema de la intervención en el metabolismo celular del medio HAT.

Transcurridos 15 días desde el procedimiento, se evaluó la producción de anticuerpos en los distintos pocillos por ELISA indirecto frente a 200 ng/pocillo del antígeno empleado en la inmunización. Aquellos pocillos que dieron una señal positiva ( $A_{405} > 0,2$ ) se resuspendieron en medio de crecimiento de hibridomas, se determinó la concentración celular y se diluyeron a una concentración de 50 células/pocillo. Se mantuvieron los cambios de medio añadiendo cada dos días medio de crecimiento de hibridomas. Las valoraciones se fueron sucediendo cada 15 días y se repitió el protocolo disminuyendo la concentración de células/pocillo en los sucesivos clonajes hasta obtener clones de hibridomas aislados (1 cel/pocillo) positivos al antígeno de interés.

### III. 2. 8. 3 Producción de AcMs

Los hibridomas se crecieron como se describe en el apartado III.2.2.3. Cuando la concentración de glucosa de la cavidad externa del CELLLine fue inferior a 200 dg/ml, se extrajeron de la cavidad intermembrana 13 ml de medio a partir de los que se purificaron los anticuerpos y se incorporaron 13 ml de medio fresco. El medio extraído se clarificó por centrifugación a 200  $\times g$ . Las inmunoglobulinas presentes se purificaron por

cromatografía de afinidad usando las columnas pre-empaquetadas con resina para la purificación de anticuerpos siguiendo las indicaciones del fabricante.

### III. 2. 8. 4 Caracterización de AcMs

Los AcMs se caracterizaron mediante SDS-PAGE, ELISA de competición para determinar las áreas antigénicas reconocidas y mediante ELISA indirecto se evaluó el tipo de inmunoglobulina obtenido, empleando como anticuerpos reveladores una batería de anticuerpos monoclonales conjugados a peroxidasa frente a los distintos isotipos de inmunoglobulina de ratón (IgE, IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4). Las características principales de los anticuerpos monoclonales anti-isotipo empleados se recogen en la Tabla III.8.

| <b>TABLA III.8   Características principales de los anticuerpos comerciales empleados en el isotipado de inmunoglobulinas</b> |                                  |                |                |                |                            |
|---|----------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------------------|
| <b>Anticuerpo</b>   | <b>Especificidad</b>             | <b>Tipo Ac</b> | <b>Isotipo</b> | <b>Especie</b> | <b>Referencia</b>          |
| Anti-IgG1 – Peroxidasa  | Cadena $\gamma 1$ de ratón       | Policlonal     | IgG            | Conejo         | Sigma-Aldrich (SAB3701171) |
| Anti- IgG2a – Peroxidasa  | Cadena $\gamma 2\alpha$ de ratón | Policlonal     | IgG            | Conejo         | Sigma-Aldrich (SAB3701178) |
| Anti- IgG2b – Peroxidasa  | Cadena $\gamma 2\beta$ de ratón  | Policlonal     | IgG            | Conejo         | Sigma-Aldrich (SAB3701185) |
| Anti-IgG3 – Peroxidasa  | Cadena $\gamma 3$ de ratón       | Policlonal     | IgG            | Conejo         | Sigma-Aldrich (SAB3701192) |
| Anti-IgA – Peroxidasa   | Cadena $\alpha$ de ratón         | Policlonal     | IgG            | Cabra          | Sigma-Aldrich (A4789)      |
| Anti- IgM – Peroxidasa  | Cadena $\mu$ de ratón            | Policlonal     | IgG            | Cabra          | Sigma-Aldrich (A8786)      |

### III. 2. 8. 5 Marcaje de AcMs

#### III. 2. 8. 5. 1 Marcaje con biotina

La inmunoglobulina tipo G (IgG) a marcar se dializó durante toda la noche frente a bicarbonato sódico 0,1 M, pH 8,5 ajustado con carbonato. A una masa de IgG  $m$  en un volumen final  $V$  se le añadieron  $m/5$  de éster de N-hidroxisucinimida de (+)-biotina disuelto en el momento de su uso en  $V/10$  de DMSO. La mezcla se incubó 3-4 h a temperatura ambiente y transcurrido ese tiempo se añadieron 20  $\mu$ l de cloruro amónico 1 M por cada mg de IgG marcado. El complejo IgG-biotina se dializó durante 48 h frente

a PBS antes de su uso, y para su conservación se diluyó en proporción 1:1 con glicerol y se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **III. 2. 8. 5. 2 Marcaje con peroxidasa**

En primer lugar, se realizó la activación de la peroxidasa. La peroxidasa se diluyó a 10 mg/ml en bicarbonato sódico 0,1 M pH 9,2 y se le añadió el mismo volumen de  $\text{NaIO}_4$  10 mM. La mezcla se incubó 2 h a temperatura ambiente en oscuridad.

El anticuerpo a marcar se dializó durante toda la noche frente a 0,1 M bicarbonato sódico pH 9,2. Por cada mg de IgG se añadió 1 mg de peroxidasa activada y se incubó 3 h a temperatura ambiente en oscuridad. Se añadió 1/10 del volumen del conjugado de  $\text{NaBH}_4$  (10 mg  $\text{NaBH}_4$ / ml de NaOH 0,1 mM) que se incubó 30 min a temperatura ambiente con agitación y otros 30 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  con agitación. Se dializó durante toda la noche frente a PBS y se añadió un volumen de glicerol para almacenarlo a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## **III. 2. 9 Obtención de aptámeros**

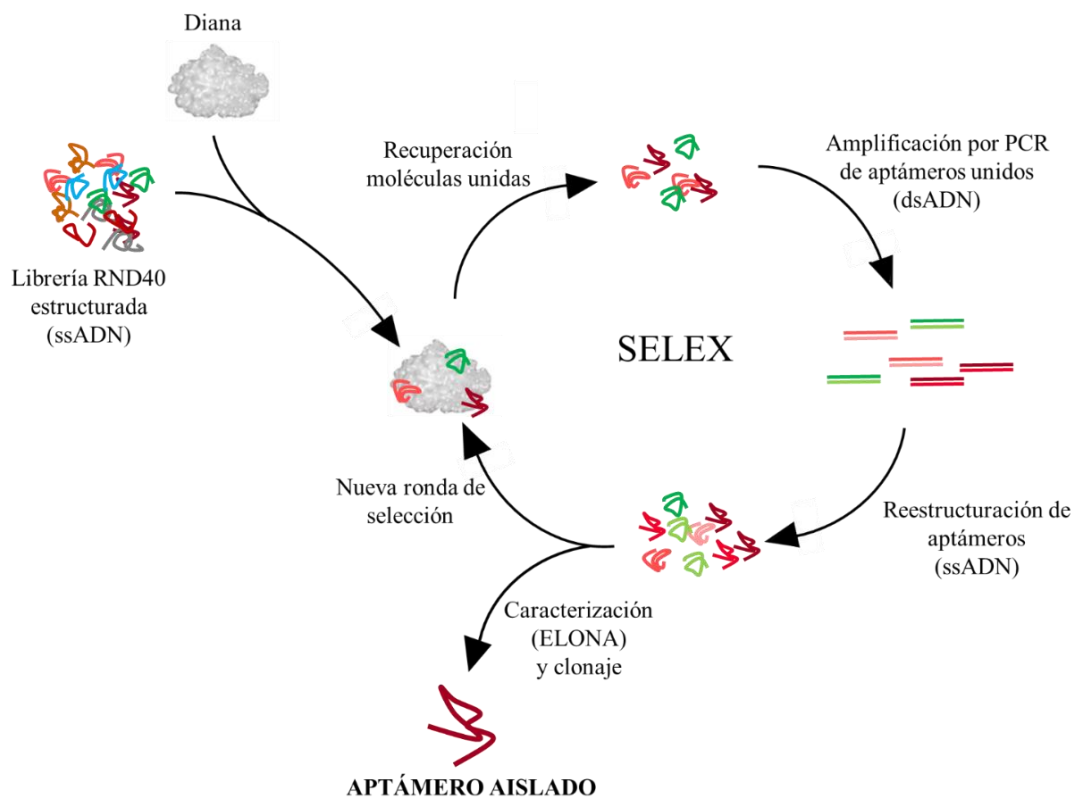
### **III. 2. 9. 1 Selección de aptámeros. SELEX**

Para la selección de aptámeros se aplicó la tecnología de evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial. Brevemente, la proteína diana se capturó en placa de microtitulación a través de un anticuerpo monoclonal específico empleado para recubrir los pocillos de la placa. La selección se llevó a cabo por rondas reiterativas de unión por incubación con la proteína diana, eliminación mediante lavados de las moléculas no unidas y amplificación por PCR. La especificidad se evaluó mediante ELONA cada 3 rondas SELEX.

En la primera ronda de selección, 100 pmol de la proteína recombinante de interés se incubaron con 1 nmol de RND40 estructurado. La placa se incubó durante 1 h a temperatura ambiente y 260 rpm para permitir la unión de los aptámeros y se lavó 3 veces con PBS, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,1 % (v/v) Tween20 para eliminar las moléculas no unidas. Se añadieron 50  $\mu\text{l}$ /pocillo de mezcla de PCR usando las secuencias F3 y R3 como cebadores, y para la elución de las secuencias unidas, los pocillos se incubaron 10 min a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  sobre placa caliente. Las mezclas de PCR se incubaron en termociclador siguiendo el siguiente protocolo: 5 min a  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ / ( $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s/ $57\text{ }^{\circ}\text{C}$  20 s/ $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s) x10 ciclos/ $4\text{ }^{\circ}\text{C}$   $\infty$ . Los productos obtenidos se resolvieron mediante electroforesis en gel de agarosa al

3 % (p/v). El fragmento correspondiente con 76 nt se cuantificó empleando el software GelQuant (DNR Bio-Imaging Systems Ltd. Neve Yamin, Israel) en base a la banda de 111+110 pb del patrón de peso molecular pUC19 DNA/MspI (Hpa II). Cuando tras este proceso se obtuvo al menos 1 µg de ADN, este material se empleó en una nueva ronda de selección. En caso contrario se re-amplificó por PCR el producto y 1 µg de producto re-amplificado se utilizó en la siguiente ronda de selección.

En las sucesivas rondas de selección, 1 µg de ADN obtenido en la ronda anterior se estructuró siguiendo el protocolo descrito previamente y se repitió el protocolo de ronda. Antes de la tercera ronda de selección, se realizó una contraselección por incubación en las mismas condiciones sobre placas que solo contenían el anticuerpo monoclonal empleado en la captura [Figura III.3].



**FIGURA III.3 | Esquema del procedimiento SELEX** para la selección de aptámeros específicos frente a un ligando concreto.

Cada 3 rondas de selección se evaluó la especificidad de la población y las rondas se sucedieron hasta obtener una especificidad suficiente por la proteína de interés. A partir de la cuarta ronda de selección se restringieron condiciones, reduciendo el tiempo de incubación entre aptámero y proteína a 30 min. Se consideró que una población tenía una

especificidad suficiente para pasar de fase, cuando la respuesta en ELONA de la población frente a la proteína fue más de cinco veces superior al control negativo. En caso de no cumplirse esta condición, se continuó con las rondas de selección.

### **III. 2. 9. 2 Marcaje de aptámeros**

El marcaje se realizó mediante PCR preparando la mezcla con cebadores F3 y R3 marcados con digoxigenina en sus extremos 5' para el marcaje de toda la población seleccionada. La PCR se realizó a los ciclos óptimos establecidos para cada caso y el producto se cuantificó como se describe en el apartado anterior.

Así mismo, para el marcaje de clones aislados, se realizaron PCRs usando plásmido purificado como molde con cebador F3 marcado en el extremo 5' con digoxigenina/cebador R3 no marcado y viceversa. De esta forma se marcaron la cadena directa y la inversa, respectivamente.

### **III. 2. 9. 3 Clonaje de la población de aptámeros**

La población seleccionada se clonó utilizando el kit comercial The Original TA Cloning kit (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del distribuidor. El producto de ligación se transformó sobre células de *E. coli* JM-109. Las bacterias se expandieron sobre placas de LB-Amp, suplementadas con 100 mM IPTG y X-Gal. Las colonias blancas (selección por interrupción del gen de la  $\beta$ -galactosidasa), se chequearon mediante PCR para verificar la presencia de inserto y los clones positivos se inoculan en 5 ml de LB-Amp para purificar los plásmidos. La secuencia de los aptámeros se determinó por secuenciación de los insertos de esos plásmidos purificados.

### **III. 2. 9. 4 Selección de clones**

La selección de los mejores aptámeros se realizó evaluando la respuesta de los clones aislados en ELONA (apartado III.2.10.2.1).

### **III. 2. 9. 5 Caracterización de aptámeros**

Los mejores aptámeros seleccionados fueron sintetizados marcados con digoxigenina y se procedió a determinar sus características. En primer lugar, se determinaron los parámetros de afinidad del aptámero. Mediante cinética de unión, se

determinó la constante de disociación ( $K_d$ ) y la capacidad máxima de unión a la proteína ( $B_{max}$ ). Para ello, se siguió el protocolo descrito en el apartado III.2.10.2.1 de ELONA empleando el aptámero marcado con digoxigenina a distintas concentraciones (25 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM y 400 nM) por triplicado. Se determinó  $A_{405}$  durante 1 h cada 10 min y los resultados se analizaron mediante el software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad, San Diego, California EE.UU.) realizando un análisis de unión específica basada en un modelo de sitio de unión único.

La predicción estructural se llevó a cabo empleando el software RNAfold WebServer (Instituto de Química Teórica, Universidad de Viena, Austria. Accesible en línea en: <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) siguiendo la predicción estructural de centroides. La capacidad de formar estructuras G-cuádruples se evaluó con el software QGRS mapper (Ramapo Bioinformatics, Nueva Jersey, EE.UU. Accesible en línea en: <http://bioinformatics.ramapo.edu/QGRS/index.php>).

## **III. 2. 10 Inmunoensayos**

### **III. 2. 10. 1 Inmunoensayos enzimáticos (ELISA)**

#### **III. 2. 10. 1. 1 ELISA directo**

Los pocillos de placas de microtitulación de poliestireno de alta capacidad de unión Stripwell™ (Costar) se tapizaron con cantidades variables de antígeno (entre 50 ng y 1 µg/pocillo) diluido en tampón carbonato a un volumen final de 100 µl/pocillo. Las placas se incubaron durante toda la noche a 4 °C. A la mañana siguiente, se realizaron 3 lavados con solución de lavado, y se bloquearon las uniones libres mediante incubación durante 1 h a temperatura ambiente con una solución de bloqueo y estabilización diseñada en Ingenasa (composición confidencial). Las placas se secaron a temperatura ambiente durante toda la noche y se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

Sobre los pocillos de las placas de microtitulación se añadieron diluciones seriadas de los distintos anticuerpos conjugados a peroxidasa en tampón de ensayo. La placa se incubó 1 h a 37 °C, se realizaron tres lavados con solución de lavado y el ensayo se reveló incubando 10 min a temperatura ambiente con ABTS. La reacción colorimétrica se detuvo añadiendo SDS al 2 % (p/v) en agua y los resultados se determinaron como  $A_{405}$  empleando un lector de placas de microtitulación SpectraMax M5 (Molecular Devices).

### **III. 2. 10. 1. 2 ELISA indirecto**

Para el desarrollo del ELISA indirecto, las placas se tapizaron siguiendo el mismo protocolo descrito para el ELISA directo.

Las muestras se diluyeron en tampón de ensayo a la dilución seleccionada en cada caso y se añadieron 100 µl/pocillo. Las placas se incubaron a la temperatura y tiempo seleccionados y, a continuación, se realizaron tres lavados. Para terminar, se añadió un anticuerpo monoclonal marcado con peroxidasa diluido en tampón de ensayo que se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. El ensayo se reveló incubando con ABTS o TMB entre 10 y 15 min. La reacción colorimétrica se detuvo con SDS al 2% (p/v) o ácido sulfúrico 0,5 M, respectivamente, y los resultados se determinaron en espectrofotómetro como  $A_{405}$  o  $A_{450}$  respectivamente.

### **III. 2. 10. 1. 3 ELISA de competición**

Las placas se tapizaron siguiendo el protocolo descrito para el ELISA indirecto. Sobre las placas estabilizadas, se añadieron las muestras de suero a una dilución  $\frac{1}{2}$  en tampón de ensayo y la placa se incubó durante 1 h a 37 °C. Se realizaron 3 lavados y seguidamente se añadió un anticuerpo monoclonal específico conjugado a peroxidasa a la dilución seleccionada en tampón de ensayo, que se incubó durante 30 min a 37 °C. Tras realizar otros tres lavados, el ensayo se reveló con TMB durante 10 min a temperatura ambiente y en oscuridad. La reacción colorimétrica se detuvo con ácido sulfúrico 0,5 M y los resultados se midieron en espectrofotómetro como  $A_{450}$ .

### **III. 2. 10. 1. 4 ELISA sándwich doble anticuerpo, DAS-ELISA**

Los pocillos de placas de microtitulación Stripwell™ Microplate High binding Polystyrene (Costar) se tapizaron a una concentración de 1 µg/pocillo del anticuerpo monoclonal específico, en un volumen final de 100 µl en tampón carbonato. Las placas se incubaron a 4 °C toda la noche. Al día siguiente, se lavaron 3 veces y se estabilizaron con 100 µl de solución de bloqueo y estabilización por pocillo que se incubó a temperatura ambiente 1 h. A continuación, se retiró la solución, las placas se dejaron secar a 25 °C durante toda la noche y se conservaron a 4 °C hasta su uso.

Para realizar el ensayo, las muestras se añadieron directamente o diluidas en diluyente de ensayo sobre los pocillos. La placa se incubó en las condiciones seleccionadas de tiempo y temperatura y, seguidamente, se lavó 3 veces. A continuación, se añadió el anticuerpo detector conjugado a peroxidasa a la dilución óptima y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente o 37 °C. Se repitieron los lavados y el ensayo se reveló con TMB (Enhanced K-Blue® TMB Substrate, Neogene), que se incubó el tiempo establecido a temperatura ambiente. La reacción colorimétrica del sustrato se detuvo con ácido sulfúrico 0,5 M y los resultados se determinaron en espectrofotómetro como  $A_{450}$ .

### **III. 2. 10. 2 Aptaensayos enzimáticos**

En este trabajo se han realizado distintos tipos de aptaensayos siguiendo el mismo esquema que en el caso anterior de los inmunoensayos, pero reemplazando parcialmente los anticuerpos por aptámeros.

#### **III. 2. 10. 2. 1 Ensayo indirecto de reconocimiento por aptámero ligado a enzima, ELONA**

El antígeno de interés se diluyó a 200 ng/pocillo en solución de tapizado (KPL coating solution), se añadieron 100  $\mu$ l/pocillo sobre los pocillos de una placa NUNC A/S y la placa se incubó toda la noche a 4 °C. A continuación, se realizaron 3 lavados y la placa se estabilizó por incubación durante 1 h a temperatura ambiente con PBS, 5% (p/v) BSA. Los aptámeros a ensayar se diluyeron a 100 ng/pocillo en PBS, 1 mM  $MgCl_2$ , se estructuraron y se añadieron 100  $\mu$ l/pocillo. La placa se incubó 1 h a 260 rpm y temperatura ambiente, se realizaron tres lavados y se añadió un anticuerpo monoclonal anti-digoxigenina marcado con peroxidasa a la dilución indicada por el fabricante en PBS, 1 % (p/v) BSA. La placa se lavó y el ensayo se reveló añadiendo 100  $\mu$ l/pocillo de ABTS que se incubó durante 20 min en oscuridad determinando  $A_{405}$ .

#### **III. 2. 10. 2. 2 Ensayo de apta-absorción ligado a enzimas, ELASA**

Los aptámeros seleccionados se sintetizaron marcados con un grupo amino mediante un link de 6 carbonos o con biotina en sus extremos 5'. Los aptámeros se estructuraron siguiendo el mismo protocolo descrito para la selección a una concentración de 100  $\mu$ M en PBS, 1 mM  $MgCl_2$ .

En el caso de trabajar con aptámeros marcados con biotina, se diluyeron a la concentración seleccionada como óptima en tampón carbonato y se tapizaron con ellos los pocillos de placas de estreptavidina. Mientras que en caso de trabajar con aptámeros marcados con grupo amino se diluyeron a la concentración óptima en tampón sciSPOT Oligo B1 o B2 1X y se utilizaron para tapizar los pocillos de placas Costar de alta capacidad de unión. En ambos casos, las placas se incubaron a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente se eliminó el contenido de los pocillos, se lavaron tres veces y estabilizaron durante 1 h a temperatura ambiente con solución de bloqueo y estabilización. Por último, se eliminó la solución y se dejaron secar a temperatura ambiente durante toda la noche. Las placas se conservaron a 4 °C hasta su uso.

Para realizar el ensayo las muestras se trataron según el protocolo optimizado para cada patología y se añadieron sobre los pocillos de la placa de ELISA. Las placas se incubaron a temperatura ambiente o 37 °C durante 2-3 h y, seguidamente, se realizaron 5 lavados. Se añadió el anticuerpo detector correspondiente marcado con peroxidasa a la dilución establecida en tampón de ensayo y se incubó 1 h a temperatura ambiente o 37 °C. Tras otros 5 lavados, el ensayo se reveló con TMB incubando entre 10 y 30 min a temperatura ambiente. Para terminar, la reacción colorimétrica se detuvo con ácido sulfúrico 0,5 M y se determinó  $A_{450}$ .

### **III. 2. 10. 3 Inmunofluorescencia**

Las células Sf9 se sembraron en cámaras de 8 pocillos sobre cristal tratado para la adherencia (Falcon, 354108) a una densidad de 165.000 cel/pocillo en un volumen final de 450  $\mu$ l. Las cámaras se incubaron durante 4 h a 27 °C para permitir la adhesión de las células y, seguidamente, se infectaron los distintos pocillos con un inóculo AcBacPAK8+VP30 de alto título a una MDI de 2 ufp/cel. Las células infectadas y control se incubaron durante 70 h a 27 °C. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron 2 veces con PBS y se fijaron con una solución 95:5 acetona:metanol incubando durante 15 min a -20 °C. Las células fijadas se lavaron 3 veces con PBS y se conservaron en PBS a 4 °C hasta la realización del ensayo.

Las células se lavaron 2 veces durante 5 min con tampón de lavado y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente con tampón de bloqueo. A continuación, se añadió el anticuerpo primario a una concentración de 10  $\mu$ g/ml en tampón de bloqueo y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente con agitación suave. Se realizaron 3 lavados de 10-

15 min con tampón de lavado y agitación suave, y se añadió un anticuerpo secundario marcado con fluoresceína a una dilución 1/600 en tampón de bloqueo que se incubó 1 h a temperatura ambiente en oscuridad. Tras esta última incubación, la cámara se desmontó y se realizaron otros 3 lavados de 10-15 min con agitación suave del portaobjetos. El portaobjetos se montó con un cubre y glicerol para su visualización y se procedió a la toma de imágenes en microscopio Nikon Eclipse TS 100 excitando con una lámpara de 470 nm a un 46 % de intensidad (CoolLED pF-100) durante 100 ms.

### **III. 2. 10. 4 Microarrays en suspensión (Luminex)**

Para el desarrollo del ensayo se llevó a cabo la unión de las proteínas diana de cada patógeno a distintas microesferas, mediante la formación de enlaces carbodiimida entre los grupos carboxilo presentes en la superficie de las microesferas y los grupos amino de las proteínas, siguiendo las indicaciones del fabricante. En este estudio se utilizaron microesferas paramagnéticas, por ser más sencillas de manipular y consiguiendo así resultados más reproducibles. Para ello, los grupos carboxilo de las microesferas ( $1 \times 10^6$ ) se activaron siguiendo el protocolo NHS/EDC descrito por la casa comercial [218]. Brevemente, las microesferas activadas se incubaron con distintas cantidades de proteína (entre 2,5 y 10  $\mu\text{g}$ ) en un volumen final de 500  $\mu\text{l}$  durante dos horas en oscuridad y con agitación rotatoria. Tras la unión se llevó a cabo un paso de bloqueo de uniones libres incubando con PBS, 10 mM imidazol durante 30 min en oscuridad y con agitación en noria. Por último, las microesferas se resuspendieron en 1 ml de tampón de almacenaje y su concentración se determinó por contaje en cámara Neubauer.

A continuación, se realizó un ensayo de confirmación de la unión, mediante el empleo de diluciones seriadas de un anticuerpo monoclonal específico, a fin de determinar la eficacia y las mejores condiciones de la unión para los ensayos.

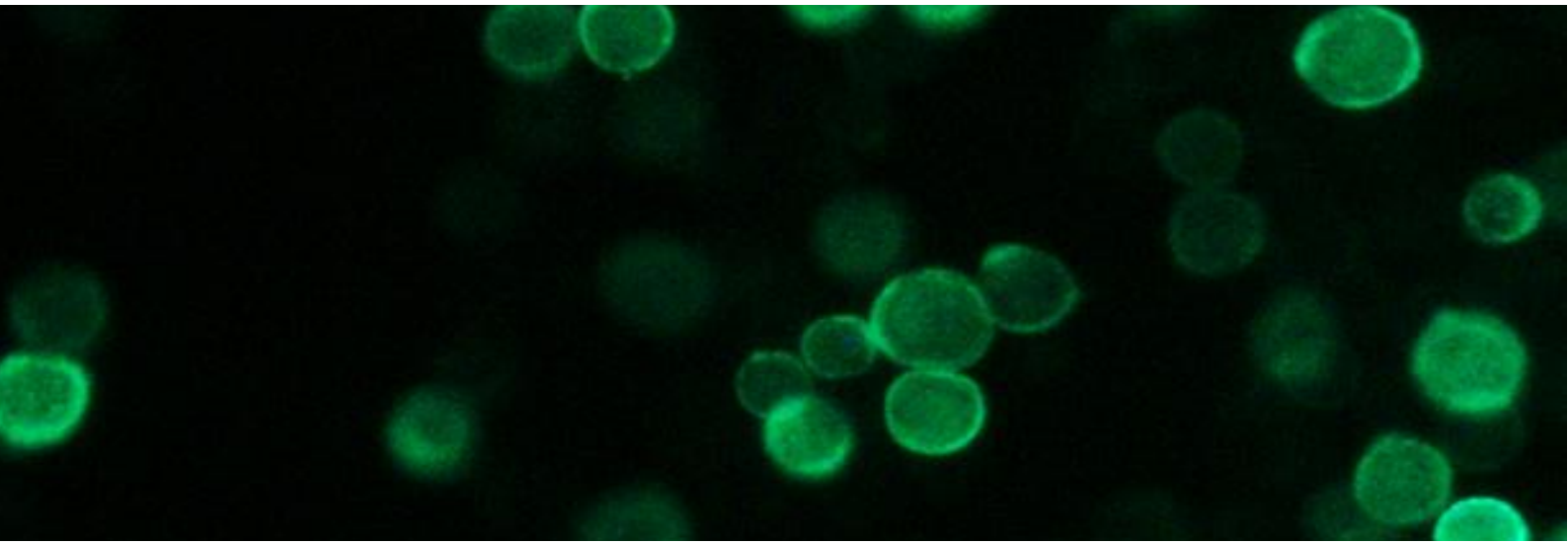
Para la realización de los ensayos múltiples se prepararon mezclas de las diferentes microesferas seleccionadas. Cada microesfera se diluyó en la mezcla a una concentración final de 25 microesferas/ $\mu\text{l}$  en tampón de ensayo (PBS, 1 % BSA en ensayo triple o PBS, 5 % leche, 0,3 % (v/v) Tween20 en ensayo séxtuple). Cincuenta microlitros de la mezcla se añadieron sobre otros 50  $\mu\text{l}$  del suero a analizar a una dilución 1/200 en tampón de ensayo en un pocillo de una placa de 96 pocillos previamente bloqueada. La mezcla de microesferas y suero se incubó durante el tiempo establecido a temperatura ambiente y 650 rpm en agitador de placas. A continuación, se realizaron 3 lavados con PBS, 0,3%

(v/v) Tween20 en lavador magnético, se añadieron 50  $\mu$ l/pocillo de un AcM  $\alpha$ -IgG de Cerdo (1BH7, Ingenasa) marcado con biotina, a 4  $\mu$ g/ml en tampón de ensayo, y se incubó en las condiciones establecidas. Se repitieron los lavados y se añadieron 50  $\mu$ l/pocillo de Estreptavidina marcada con ficoeritrina a 2  $\mu$ g/ml, que se incubó en las condiciones óptimas establecidas. Para terminar, se lavó la placa y se resuspendió en 100  $\mu$ l de PBS, 0,3% (v/v) Tween20. La lectura del ensayo se realizó empleando los equipos MagPIX o Bio-Plex 200, determinando mediana de intensidad de fluorescencia (MFI) de la ficoeritrina de al menos 100 eventos por pocillo para cada código de microesfera.

### **III. 2. 11 Análisis estadístico**

Para la determinación del mejor punto de corte en cada ensayo los datos se analizaron con el software MedCalc 10.1.7.0 (MedCalc Software Ltd., Seúl, República de Corea) mediante un análisis de curva ROC. La evaluación estadística de los parámetros diagnósticos entre distintas plataformas se realizó mediante análisis de McNemar para muestras correlacionadas (mismos animales a distintos días post-infección) o mediante un análisis de concordancia determinando el valor del factor kappa de Cohen (comparación RT-qPCR-ELISA). Por último, para la determinación de los intervalos de confianza al 95% de las secciones en que las muestras fueron clasificadas se empleó el intervalo de puntuación de Wilson usando el software libre OpenEpi 3.01 [219].





# **RESULTADOS**



## **IV. Resultados**

A fin de facilitar la exposición de los resultados, éstos se han organizado en cuatro apartados con objetivos concretos, dirigidos a mejorar algunas de las lagunas identificadas en los métodos diagnósticos frente a las patologías estudiadas disponibles hasta la fecha.

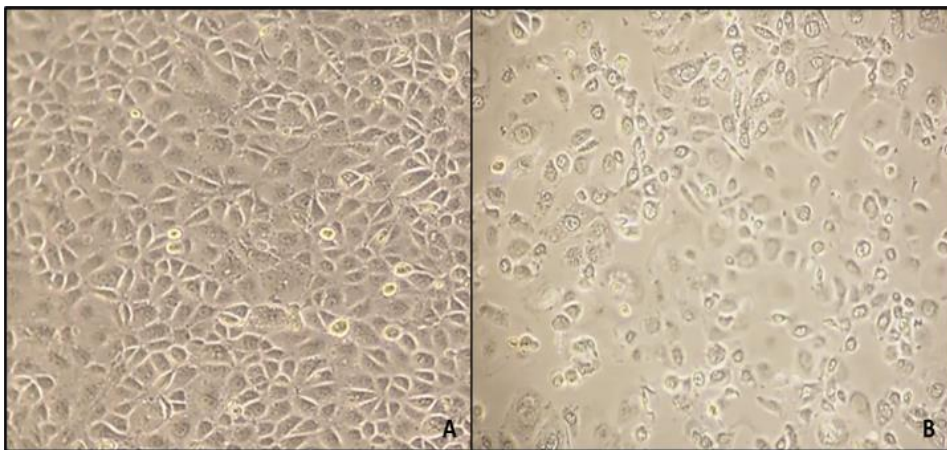
### **IV. 1. Desarrollo de ensayos de detección de antígeno en muestras digestivas empleando aptámeros**

La diarrea vírica porcina es una patología de alto impacto para la industria que afecta principalmente a lechones debido a la inmadurez de su sistema inmune y causa enormes pérdidas económicas. Los virus más habituales que aparecen causando este cuadro son los coronavirus PEDV y TGEV y los rotavirus pertenecientes al grupo A. Estos tres patógenos dan paso a unos cuadros clínicos muy similares, imposibilitando el diagnóstico por observación clínica, y obligando a realizar un diagnóstico diferencial empleando pruebas de laboratorio [122, 125].

Actualmente, el diagnóstico del rotavirus porcino tipo A puede realizarse mediante diversas tecnologías: neutralización de virus, aislamiento de virus, inmunofluorescencia, RT-PCR, ELISA e incluso LFA y se dispone de ensayos comerciales para el diagnóstico [122]. Sin embargo, la sensibilidad de los ensayos tipo ELISA y LFA disponibles, aunque mejor que para otras patologías en las que la carga viral es menor, sigue sin igualar a la sensibilidad de la RT-PCR. Por ese motivo, en la presente tesis se ha trabajado en la mejora de los ensayos disponibles para detección de antígeno de rotavirus porcino tipo A a través de una tecnología novedosa como es el uso de aptámeros. Para el diagnóstico se seleccionó como diana la proteína VP6 por ser el antígeno empleado para la clasificación de los rotavirus en grupos.

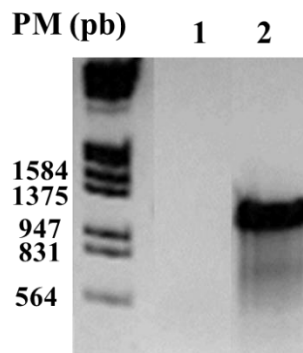
### IV. 1. 1 Clonaje, expresión y purificación de proteínas recombinantes

Como material de partida para la amplificación y posterior clonaje del gen codificante de la VP6 de PRVA se partió del inóculo VR-893<sup>TM</sup> de este virus obtenido de la ATCC. El inóculo se amplificó sobre cultivo de células MA104 como se detalla en el apartado de materiales y métodos a fin de obtener un stock de virus. En la siguiente figura se muestra el efecto citopático causado por el virus sobre la monocapa de células MA104.



**FIGURA IV.1 | Cultivo de PRVA sobre monocapa de células MA104. A.** Células MA104 sin infectar. **B.** Células MA-104 tras 24 h de infección con PRVA.

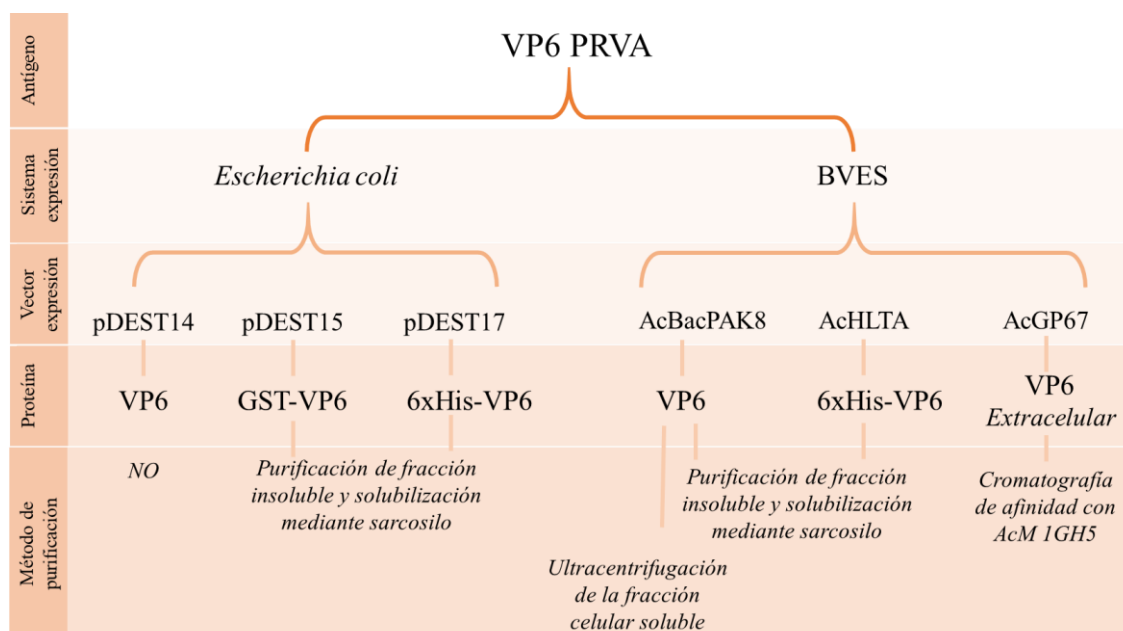
El ARN genómico del virus se extrajo y se amplificó la secuencia de interés mediante RT-PCR como se recoge dentro del apartado III.2.4 de materiales y métodos, obteniéndose una banda de aproximadamente 1200 pb, correspondiente al tamaño esperado [Figura IV.2].



**FIGURA IV.2 | Amplificación del gen codificante de la proteína VP6 de PRVA.** Electroforesis en gel de agarosa y tinción con gelRed de **1.** Control negativo y **2.** Gen VP6 amplificado, tras RT-PCR (tamaño esperado 1196pb).

Tras la amplificación por RT-PCR, el producto de PCR se purificó por electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión, se clonó en el plásmido de clonaje del sistema Gateway (pCR8/TOPO/GW) y, a partir de éste, se subclonó en diversos plásmidos de expresión. Para la expresión en el sistema heterólogo de *E. coli*, el gen codificante de la proteína de interés se clonó en los plásmidos: pDEST14 para la expresión de la proteína sin péptidos de fusión, pDEST15 para la expresión de la VP6 fusionada a GST y pDEST17 para la expresión de la VP6 fusionada al péptido 6xHis [Tabla III.3].

En total, en el presente trabajo de tesis se obtuvieron 6 variantes de la proteína VP6 de PRVA que se recogen a modo de resumen en la Figura IV.3.

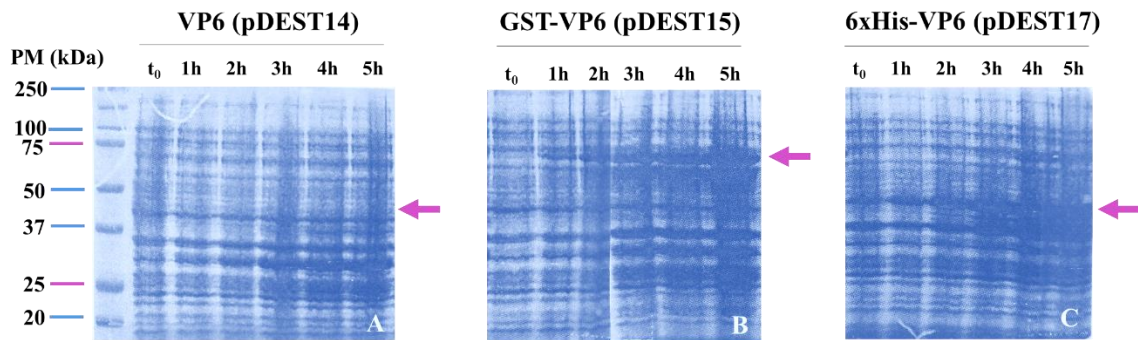


**FIGURA IV.3 | Resumen esquemático de las distintas proteínas VP6 recombinantes.** En la figura se indica el sistema de expresión empleado para la obtención de cada variante de VP6, el vector de expresión, la proteína producida indicando en caso necesario los péptidos de fusión y el método de purificación aplicado para la recuperación.

En primer lugar, se seleccionaron las mejores condiciones para la expresión de las proteínas recombinantes. Para ello, se realizó una cinética de expresión con células *E. coli* BL21-AI transformadas con los plásmidos obtenidos y se valoraron los extractos celulares totales a distintos tiempos post-inducción mediante SDS-PAGE y posterior tinción con azul de Coomassie y *western blot*.

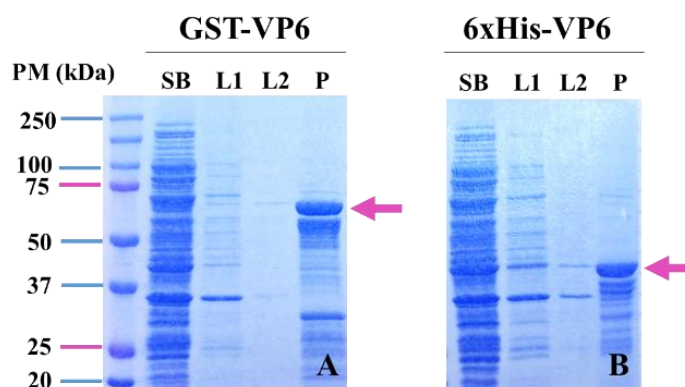
## Resultados

Como se muestra en la Figura IV.4B-C, tanto en el caso de la construcción pDEST15+VP6 como para la pDEST17+VP6 se observa un aumento lineal con el tiempo de una banda que corresponde con los tamaños esperados para las proteínas expresadas en estas construcciones (70 kDa y 46,5 kDa respectivamente).



**FIGURA IV.4 | Cinética de expresión de la proteína VP6 en células de *E. coli*.** Análisis mediante SDS-PAGE y posterior tinción con azul de Coomassie de los extractos totales bacterianos recogidos a distintos tiempos post-inducción (de 0 ( $t_0$ ) a 5 h) en células *E. coli* (BL21) transformadas con los distintos plásmidos de expresión. La flecha indica los pesos moleculares esperados para las proteínas expresadas en cada caso: **A.** pDEST14+VP6, (VP6, 44 kDa), **B.** pDEST15+VP6 (GST-VP6, 70 kDa) y **C.** pDEST17+VP6, (6xHis-VP6, 46,5 kDa).

Mediante *western blot* con anticuerpos monoclonales específicos frente a los péptidos de fusión (GST y 6xHis respectivamente), se comprobó que la proteína que aumentaba su expresión en cada caso era la proteína recombinante de interés (resultado no mostrado). Sin embargo, en el caso de la construcción pDEST14+VP6 [Figura IV.4A], se observa el aumento de una proteína de aproximadamente 30 kDa, un tamaño menor al esperado (44 kDa) que no fue reconocida en *western blot* por el anticuerpo monoclonal 1GH5 (anti-VP6, Rotavirus) disponible por trabajos previos del laboratorio, por lo que esta construcción se descartó. Las proteínas producidas se encontraban en la fracción insoluble de las células, de modo que, a partir del cultivo recogido a las 5 h post-inducción, se procedió a la purificación de éstas a partir de cuerpos de inclusión bacterianos y posterior solubilización mediante sarcosilo, como se describe en el apartado III.2.7.1.1 de materiales y métodos. Las distintas fracciones recogidas durante el proceso se evaluaron mediante SDS-PAGE y posterior tinción con azul de Coomassie y *western blot*.



**FIGURA IV.5 | Purificación a partir de cuerpos de inclusión bacterianos de la proteína VP6.**

Análisis mediante SDS-PAGE de las fracciones recogidas durante proceso de purificación de las proteínas recombinantes producidas en *E. coli* (BL21) a 5 h post-inducción: **A.** GST-VP6 y **B.** 6xHis-VP6. **SB**, Fracción celular soluble; **L1**, primer lavado de la fracción celular insoluble; **L2**, segundo lavado; **P**, proteína semipurificada.

Como se observa en la Figura IV.5, el protocolo de purificación aplicado muestra una eficiencia muy alta, perdiéndose una mínima cantidad de proteína en el proceso. En ambos casos, la proteína mayoritaria obtenida tras la purificación fue la proteína recombinante de interés VP6. Si bien, se observan también proteínas de un tamaño menor al esperado que pueden deberse, en parte, a un proceso parcial de proteólisis por la recogida del cultivo a un tiempo largo post-inducción que trae consigo el aumento de proteasas en el medio.

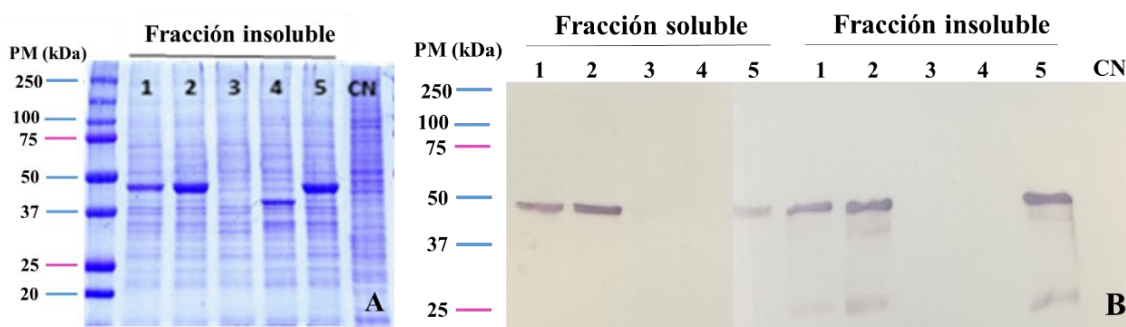
Las proteínas se cuantificaron en base a una curva de BSA obteniéndose una concentración final de 0,75 mg/ml (GST-VP6) y 1 mg/ml (6xHis-VP6) con un rendimiento total de 9 mg y 8 mg, respectivamente, a partir de un cultivo de 100 ml de bacterias. En base a los resultados obtenidos, para la obtención de las proteínas GST-VP6 y 6xHis-VP6, se seleccionaron como condiciones óptimas para la expresión, la recogida del cultivo 5 h tras la inducción de la expresión de la proteína recombinante.

Por otro lado, para la expresión heteróloga en células de insecto empleando el sistema de expresión de baculovirus (BVES), el gen codificante de la VP6 se subclonó a partir del plásmido de clonaje en los plásmidos de transferencia: pAcGP67/GW para la expresión extracelular de la proteína, pBacPAK8/GW para la expresión intracelular de la proteína sin etiquetas y pAcHLTA/GW para la expresión intracelular de la proteína fusionada al péptido 6xHis [Tabla III.3].

## Resultados

Los plásmidos de transferencia pBacPAK8/GW+VP6, pAcHLTA/GW+VP6 y pAcGP67/GW+VP6 se emplearon para la obtención de baculovirus recombinantes mediante cotransfección de células Sf9 con el ADN de baculovirus BacPAK6 digerido con la enzima de restricción Bsu36I y el plásmido de transferencia con el gen de interés, siguiendo los protocolos descritos en el apartado III.2.3.1 de materiales y métodos. Tras realizar el aislamiento de clones de baculovirus siguiendo el protocolo descrito en el apartado III.2.3.2, se seleccionaron 5 placas de lisis blancas y se evaluó su capacidad de expresión de proteína recombinante. Aquellos clones que mostraron mayor capacidad de producción se emplearon para obtener inóculos de alto título viral. A modo de ejemplo, se muestran los resultados obtenidos en la selección del mejor clon para el baculovirus recombinante AcHLTA+VP6.

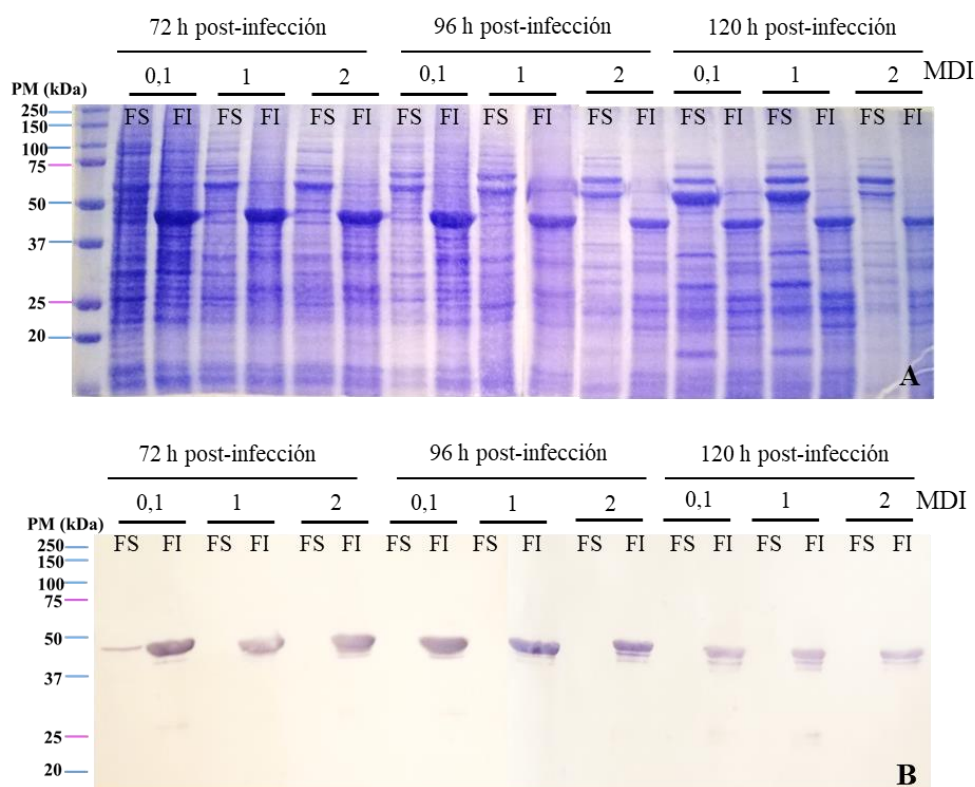
Como se observa en la Figura IV.6A, las placas de lisis 1, 2 y 5 muestran un alto nivel de producción de una proteína cuyo peso molecular coincide con el esperado para la proteína recombinante de interés (46 kDa). Por evaluación mediante *western blot* con un anticuerpo monoclonal específico del péptido de fusión de la proteína [Figura IV.6B], se confirmó que la proteína del tamaño esperado se trataba de la proteína de interés, que se localizaba tanto en la fracción celular soluble como en la insoluble. Para la obtención del inóculo de alto título viral, se seleccionó el clon 2 de baculovirus recombinante AcHLTA+VP6. En el caso del clon 3, no se aprecia sobreexpresión de ninguna proteína mientras que en el caso del clon 4, la sobreexpresión es de una proteína de un tamaño ligeramente inferior al esperado que no fue reconocida de forma específica por el anticuerpo monoclonal anti-6xHis, por lo que estos virus se descartaron.



**FIGURA IV.6 | Análisis de la expresión de la proteína VP6 (AcHLTA+VP6).** Análisis mediante SDS-PAGE de la producción de proteína recombinante VP6 por infección de células Sf9 con clones aislados de baculovirus AcHLTA+VP6. **A.** Tinción con azul de Coomassie de la fracción insoluble de las células Sf9 infectadas con 5 clones aislados (1-5) de baculovirus AcHLTA-VP6. **B.** Evaluación mediante *western blot* con el AcM anti-6xHis de fracciones celulares insolubles y solubles de las mismas células infectadas.

Este mismo flujo de trabajo se siguió para la obtención de baculovirus recombinantes AcBacPAK8+VP6 y AcGP67+VP6. Tras la obtención de los inóculos de alto título viral, se determinaron las concentraciones virales de cada uno de ellos, estableciéndose en  $8 \times 10^8$  ufp/ml para el inóculo de baculovirus recombinante AcHLTA+VP6,  $6,5 \times 10^8$  ufp/ml para el de AcBacPAK8+VP6, y  $7 \times 10^8$  ufp/ml para el de AcGP67+VP6. A partir de los inóculos de alto título se realizaron experimentos reproducibles para seleccionar las condiciones óptimas de expresión de las proteínas de interés.

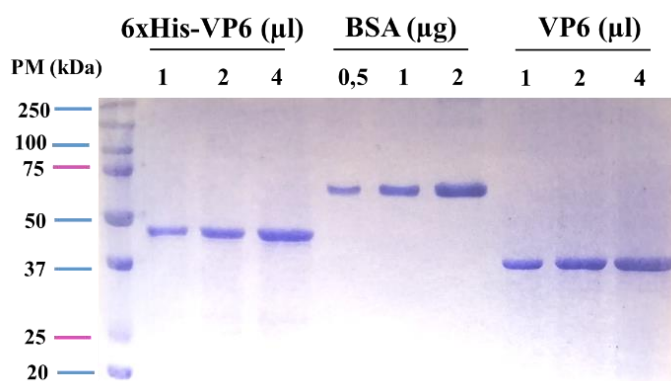
Por experiencia previa del laboratorio, para la expresión de proteína de forma intracelular (AcHLTA+VP6 y AcBacPAK8+VP6) se ensayaron multiplicidades de infección (MDI) de 0,1, 1 y 2 tomando muestras a las 72, 96 y 120 h post-infección que se procesaron separando fracción soluble e insoluble como se describe en materiales y métodos. A continuación, se muestran los resultados obtenidos a partir del inóculo de baculovirus recombinante AcHLTA+VP6 [Figura IV.7].



**FIGURA IV.7 | Cinética de expresión de la proteína 6xHis-VP6 en células Sf9.** Análisis mediante SDS-PAGE de las fracciones celulares solubles (FS) e insolubles (FI) recogidas a distintas MDI y tiempos post-infección empleando el inóculo AcHLTA+VP6, para su posterior análisis mediante tinción con azul de Coomassie (A) y *western blot* con el AcM 1GH5 (B).

## Resultados

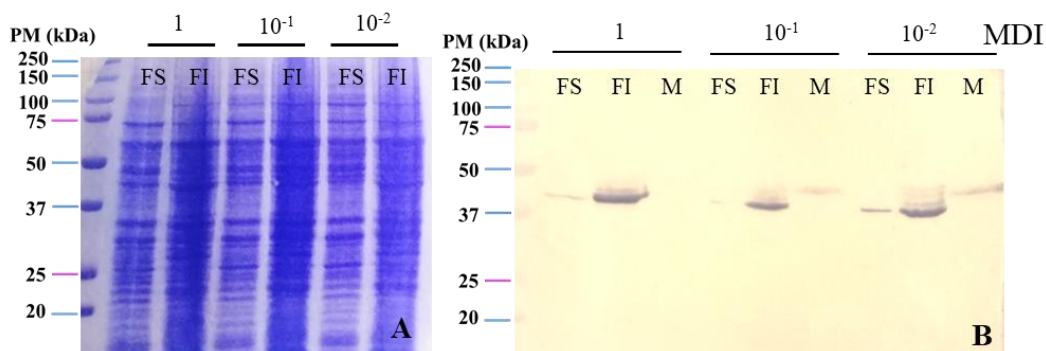
Tanto en el caso del inóculo de baculovirus recombinante AcHLTA+VP6 como en el de AcBacPAK8+VP6 (resultado no mostrado), se establecieron como condiciones óptimas para la producción de las proteínas de interés la infección a una MDI de 1 ufp/cel con recogida del cultivo a las 96 h post-infección. En ambos casos, la totalidad de la proteína recombinante producida se obtuvo en la fracción celular insoluble, por lo que se procedió a su purificación a partir de esta fracción mediante solubilización con sarcosilo. En el caso de la VP6 (AcBacPAK8+VP6), parte de la proteína producida se perdió durante el protocolo de purificación, especialmente en las fases de lavado.



**FIGURA IV.8 | Cuantificación mediante SDS-PAGE de las proteínas 6xHis-VP6 (AcHLTA+VP6) y VP6 (AcBacPAK8+VP6).** Proteínas expresadas de forma intracelular en células de insecto y purificadas a partir de la fracción celular insoluble y posterior solubilización con sarcosilo, cuantificadas en referencia a curva de BSA.

Las proteínas recombinantes se cuantificaron en base a una curva de BSA [Figura IV.8] obteniéndose a una concentración de 0,4 mg/ml (6xHis-VP6, AcHLTA+VP6) y 0,6 mg/ml (VP6, AcBacPAK8+VP6), con una pureza en ambos casos muy elevada, no observándose otras bandas de proteínas en SDS-PAGE, como se muestra en la Figura IV.8. En ambos casos, los rendimientos totales obtenidos fueron elevados, alcanzándose un rendimiento de 8 mg por  $1 \times 10^8$  cel Sf9 y 6 mg por  $1 \times 10^8$  cel Sf9, respectivamente.

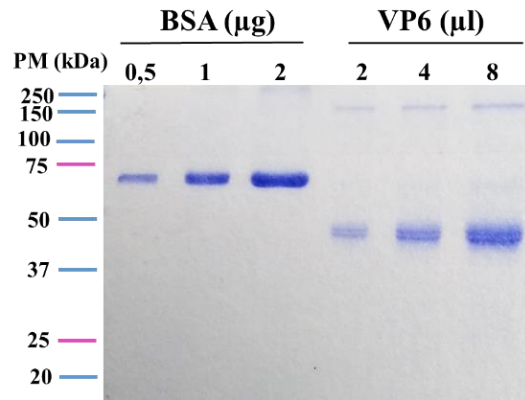
Del mismo modo, con los baculovirus diseñados para la expresión extracelular (AcGP67+VP6) se infectaron células adaptadas al crecimiento en medio sin suero (Sf900) con multiplicidades más bajas, de 1,  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$  ufp/cel, recogiendo muestras a los mismos tiempos post-infección (72, 96 y 120 h), y evaluando tanto las fracciones celulares de las Sf900 como el medio de cultivo. En la Figura IV.9 se muestran los resultados obtenidos a las 120 h post-infección.



**FIGURA IV.9 | Cinética de expresión de la proteína VP6 en células Sf900.** Análisis mediante SDS-PAGE de la fracción celular soluble (FS), insoluble (FI) y medio de cultivo (M) recogidas a 120 h post-infección con el inóculo AcGP67+VP6, para su posterior: (A) tinción con azul de Coomassie y (B) evaluación mediante *western blot* con el AcM 1GH5.

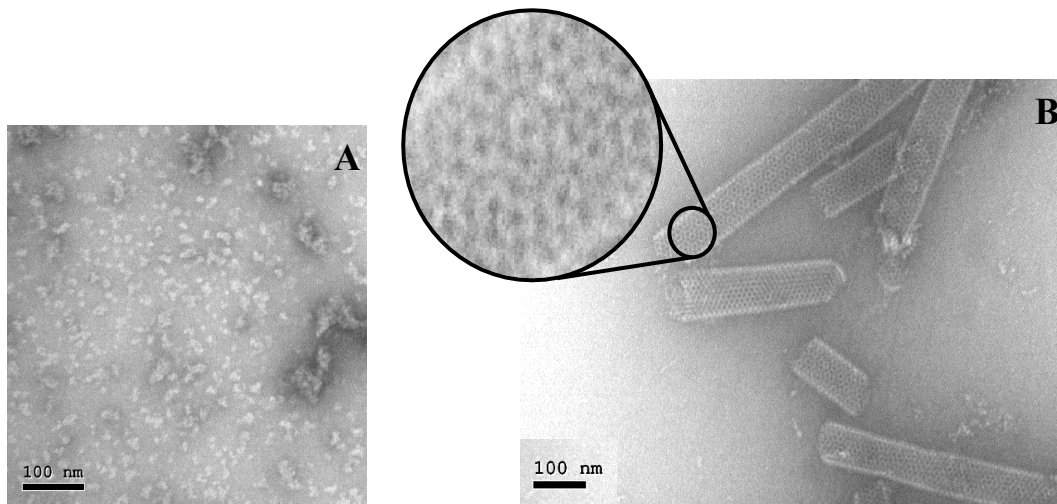
En este caso, no se aprecia una clara sobreexpresión de ninguna proteína en las fracciones celulares de las Sf900 analizadas [Figura IV.9A], obteniéndose la proteína recombinante en la fracción extracelular. De la observación de la figura IV.9B, se puede deducir que, en su proceso de secreción, la proteína VP6 sufre una modificación que aumenta su peso molecular de forma secuencial en SDS-PAGE. Al favorecer el paso de la proteína por la maquinaria de secreción, lo más factible era que la proteína se modificara por un proceso post-traducciona de glicosilación, que se confirmó mediante tinción PAS de la proteína purificada (resultado no mostrado). Este proceso se ve favorecido al infectar los cultivos celulares a MDI bajas y recogerlos a tiempos largos post-infección. Como condiciones óptimas se seleccionaron la infección con baculovirus recombinantes AcGP67+VP6 a 10<sup>-2</sup> ufp/cel con recogida del cultivo a las 120 h post-infección.

La purificación de esta proteína soluble del medio de cultivo se realizó mediante purificación por cromatografía de afinidad con el AcM 1GH5. La proteína se obtuvo con una elevada pureza y a una concentración de 0,2 mg/ml [Figura IV.10], obteniéndose un rendimiento total de 1 mg de proteína por cada 1x10<sup>8</sup> células infectadas. En el análisis de SDS-PAGE de la proteína VP6 extracelular, se observó la presencia clara de una proteína contaminante de más de 150 kDa de peso molecular, que fue reconocida de forma específica por el AcM 1GH5 en análisis mediante *western blot*.



**FIGURA IV.10 | Cuantificación de la proteína VP6 expresada en células Sf900.** Análisis mediante SDS-PAGE y posterior tinción con azul de Coomassie de la proteína VP6 (AcGP67) para cuantificación en base a curva de BSA

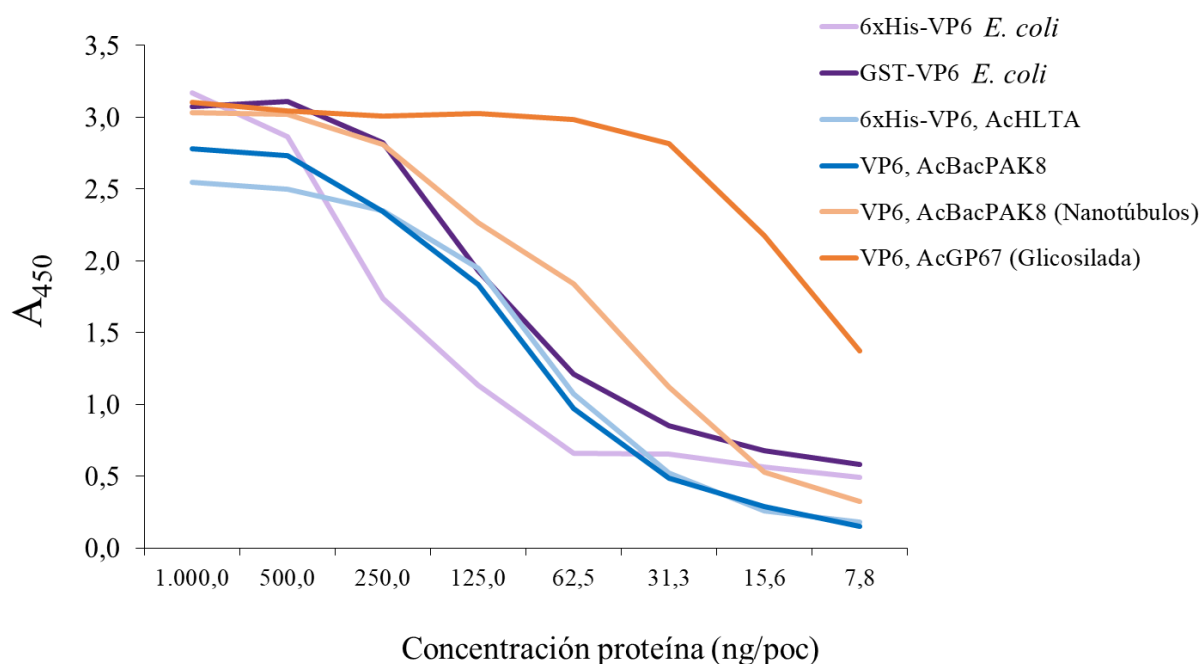
Por último, dado que la proteína VP6 forma en el virus una cápsida de forma independiente, se evaluó la capacidad de las proteínas recombinantes producidas en células de insecto de formar estructuras cuaternarias. En el caso de la proteína VP6 producida en la fracción celular insoluble (AcBacPAK8+VP6) se aplicó el protocolo de purificación por ultracentrifugación sobre colchones de sacarosa, mientras que las proteínas producidas extracelularmente se observaron directamente mediante microscopía electrónica, tras la purificación por cromatografía de afinidad, para evaluar su capacidad de formar estructuras de forma espontánea.



**FIGURA IV.11 | Fotografías de microscopía electrónica de la proteína VP6 recombinante.** Fotografías tomadas tras tinción negativa de las proteínas recombinantes VP6 obtenidas en células de insecto. **A.** Proteína expresada de forma extracelular (AcGP67+VP6) y purificada por columna de afinidad. **B.** Proteína expresada de forma intracelular (AcBacPAK8+VP6) y purificada por ultracentrifugación sobre colchones de sacarosa. La barra muestra el tamaño a dichos aumentos de 100 nm.

En la Figura IV.11 se observa que las proteínas glicosiladas no forman de manera espontánea estructuras cuaternarias en el medio de cultivo. Así, en la fotografía de microscopía electrónica solo se observa la presencia de proteínas globulares que, según bibliografía, podrían corresponderse con trímeros de la proteína VP6 [Figura IV.11A]. Así mismo, tras aplicar el protocolo de ultracentrifugación sobre gradientes de sacarosa, donde se favorece la formación de uniones entre proteínas, la proteína VP6 expresada de forma intracelular en células de insecto forma nanotúbulos de alrededor de 75 nm de diámetro con un patrón que coincide con las fotografías de microscopía electrónica del PRVA [Figura I.11; Figura IV.11B]. Mediante este protocolo se obtuvo un rendimiento muy elevado de 12 mg totales de un cultivo de  $1 \times 10^8$  cel.

La inmunogenicidad de las distintas proteínas recombinantes VP6 obtenidas se evaluó mediante ensayo ELISA indirecto con un suero de referencia para Rotavirus porcino disponible en el laboratorio.



**FIGURA IV.12 | Evaluación de la inmunogenicidad de las proteínas VP6 de PRVA.** Señales de  $A_{450}$  obtenidas en ELISA indirecto realizado sobre pocillos tapizados a concentraciones decrecientes de la proteína VP6 a evaluar.

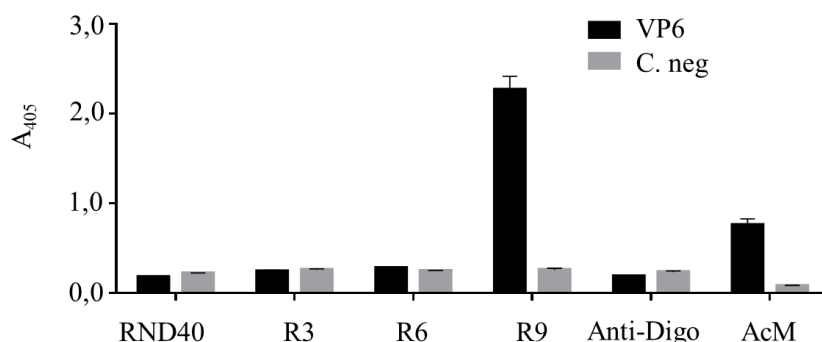
Como se observa en la gráfica de la Figura IV.12, las proteínas producidas en *E. coli* mostraron una curva de titulación que se aplanó a partir de valores de 0,5 de Absorbancia para las dos proteínas, no obteniéndose valores por debajo de ese valor. Estos valores de Absorbancia en muestras negativas pueden deberse a la presencia de

proteínas contaminantes del sistema de *E. coli* que comprometerían el desarrollo de ensayos tipo ELISA indirecto, por lo que se descartaron. Tanto la proteína 6xHis-VP6 (AcHLTA+VP6) como la proteína VP6 (AcBacPAK8+VP6) producidas en BVES y purificadas a partir de la fracción celular insoluble muestran buenas curvas de titulación, llegando prácticamente a valores de 0 de Absorbancia y obteniéndose lecturas superiores a 2 para los puntos de mayor concentración de proteína recombinante. En ambos casos, el último punto de proteína detectado se corresponde con el pocillo tapizado a 15,6 ng/pocillo. Al aplicar el protocolo de purificación por ultracentrifugación sobre colchones de sacarosa, el reconocimiento de la proteína VP6, AcBacPAK8 expresada en BVES se ve incrementado, detectando menores cantidades de proteína recombinante que con la proteína que, presumiblemente, estará sin estructurar por el protocolo de purificación aplicado. La proteína glicosilada (VP6, AcGP67+VP6) fue, con diferencia, la que mejores resultados mostró, detectándose menores cantidades de proteína recombinante que con el resto de las proteínas producidas. Sin embargo, dado que el motivo estructural observado en los nanotúbulos fue idéntico al observado en el virus nativo, se decidió emplear dicha proteína para la selección de aptámeros, por preverse que reconocerían de forma más específica las partículas virales del PRVA.

### IV. 1. 2 Selección de aptámeros específicos frente a la VP6

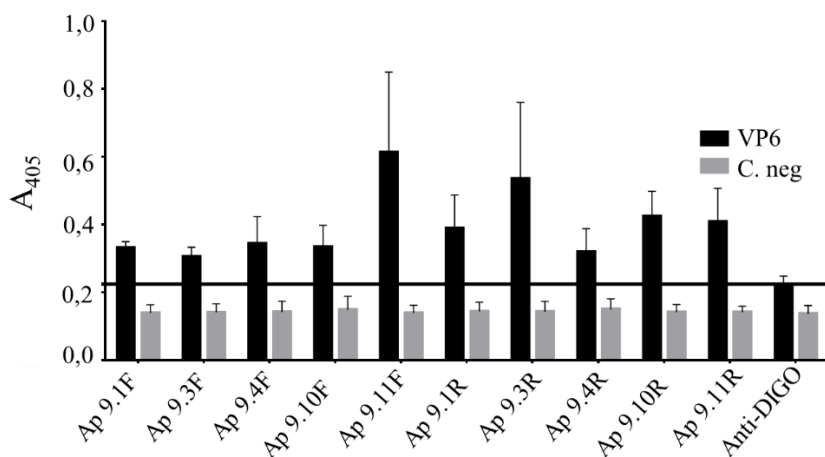
La selección de aptámeros específicos se llevó a cabo sobre placas de microtitulación. Los nanotúbulos se capturaron en los pocillos a través del AcM 1JF10 y como contraselección se emplearon pocillos tapizados únicamente con el AcM, en ausencia de nanotúbulos.

Para la selección, se emplearon 100 pmol de proteína recombinante (3 pocillos) que se incubaron siguiendo el protocolo descrito en materiales y métodos. En total, hubo que realizar 9 rondas SELEX para la obtención de una especificidad suficiente, así como 3 rondas de contraselección antes de las rondas 3, 6 y 9. Las poblaciones obtenidas tras las rondas 3, 6 y 9 se marcaron con digoxigenina para evaluar su respuesta frente al antígeno diana en ensayo ELONA [Figura IV.13].



**FIGURA IV.13 | Evaluación de poblaciones SELEX frente a la VP6 mediante ELONA.** Señal de  $A_{405}$  en ELONA frente a la VP6 (AcBacPAK8) de PRVA de las poblaciones de aptámeros obtenidas tras las rondas 3 (R3), 6 (R6) y 9 (R9) del proceso SELEX de selección, así como de la población inicial RND40, marcadas con digoxigenina. Como proteína negativa se incluyó BSA. Como control negativo, los pocillos se incubaron en ausencia de aptámeros (Anti-Digo).

De la observación de la Figura IV.13 se determinó que la especificidad de la ronda 9 de selección aplicando la metodología SELEX tenía una especificidad suficiente por la proteína VP6 de PRVA para la identificación de aptámeros individuales, por lo que esta población se clonó y se evaluó la respuesta de los clones aislados mediante ELONA a fin de seleccionar a los mejores candidatos [Figura IV.14].

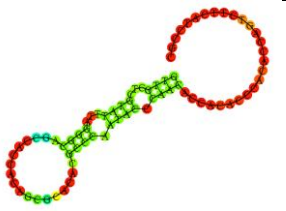

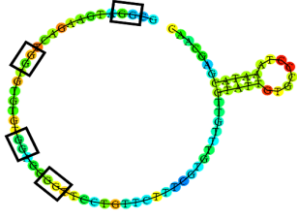


**FIGURA IV.14 | Evaluación mediante ELONA de clones de aptámeros aislados frente a la VP6.** Señal de  $A_{405}$  obtenida mediante ELONA frente a la VP6 (AcBacPAK8) de PRVA y la proteína empleada como control negativo (BSA), incubando con aptámeros marcados con digoxigenina de forma diferencial en la cadena directa (F) o reversa (R) a partir de clones aislados. Como control negativo se introdujeron pocillos incubados en ausencia de aptámeros (Anti-DIGO).

Los mejores candidatos de acuerdo con los resultados observados en la Figura IV.14 fueron los aptámeros: 9.3R, 9.10R y 9.11F, que se sintetizaron de forma química y se

## Resultados

realizó su caracterización. Los valores de afinidad de estas moléculas se recogen en la siguiente tabla.

| TABLA IV.1   Características de los aptámeros seleccionados frente a la proteína VP6 de PRVA (media $\pm$ desviación estándar, SD) |  |                   |                          |
|--|--|-------------------|--------------------------|
| Nombre   | Estructura   | Kd (nM)           | Bmax (A <sub>405</sub> ) |
| Ap 9.3R  |   | ND                | ND                       |
| Ap 9.10R   |   | 1,990 $\pm$ 0,121 | 2,395 $\pm$ 0,076        |
| Ap 9.11F   |  | 5,916 $\pm$ 2,555 | 3,102 $\pm$ 0,769        |

Como se muestra en la Tabla IV.1, los aptámeros seleccionados muestran unos parámetros de afinidad prometedores, con constantes de disociación (Kd) del orden nM, lo que hace que sean buenos candidatos para el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos. Así mismo, los valores de Absorbancia máxima a 405 nm (Bmax) de todos los aptámeros se encuentran entre 2,3 y 3,1, permitiendo amplios rangos de Absorbancia en los ensayos diagnósticos.

La predicción estructural *in silico* realizada con el software RNAfold de los aptámeros 9.3R, 9.10R y 9.11F se muestra en la Tabla IV.1. La escala de color indica la probabilidad de formación de puentes de hidrógeno entre bases, asociando los colores cálidos (rojo, naranja y amarillo) con una mayor probabilidad de formación de uniones que los colores fríos (azul y verde). Con recuadros negros se marcan los residuos de guanina implicados en la formación de un plano G-cuádruple. De los tres aptámeros, el más estable de acuerdo con la predicción estructural *in silico* es el aptámero 9.11F puesto que, según el software empleado, presenta la capacidad de formar una estructura G-cuádruple en su configuración tridimensional.

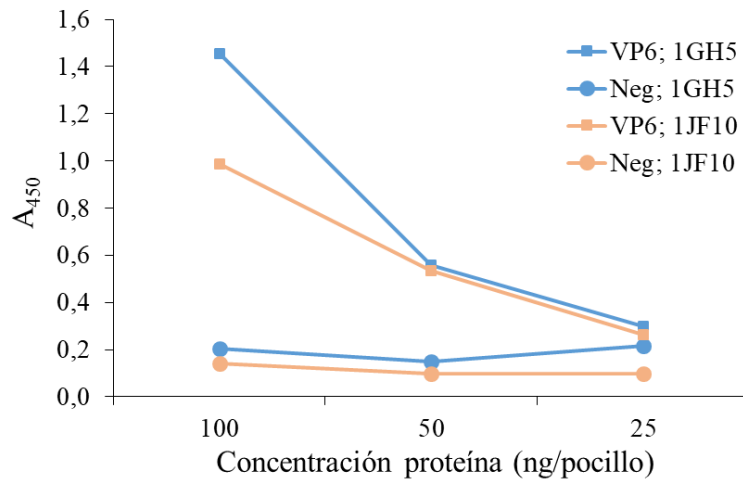
### **IV. 1. 3 Desarrollo de inmunoensayos ELASA para la detección de antígeno en muestras**

Los cuatro aptámeros seleccionados se emplearon para tratar de desarrollar ensayos ELASA. Como técnica de referencia, se empleó el DAS-ELISA comercial INgezim 11.RTP.K3, validado para la detección de antígeno de PRVA en muestras de heces que emplea para la captura y detección del virus el mismo anticuerpo monoclonal: 1JF10.

En primer lugar, todos los aptámeros seleccionados se sintetizaron con un grupo biotina en el extremo 5'. Los aptámeros se tapizaron a una concentración saturante (0,5  $\mu$ M) sobre placas de estreptavidina y se realizó una dilución seriada de la proteína recombinante. De este ensayo se determinó que el mejor aptámero para emplear como molécula capturadora era el aptámero 9.3R, por ser el que mayores señales exhibía con la proteína diana VP6, mostrando unas señales de Absorbancia bajas con la proteína empleada como control negativo y mostrando una buena especificidad. El aptámero 9.10R mostró señales más bajas por la proteína diana que el 9.3R en la primera aproximación, pero, dado que no exhibió señales elevadas de Absorbancia con el control negativo, se continuó trabajando con él para seleccionar las mejores condiciones. Por último, el aptámero 9.11F exhibió las señales más elevadas con la proteína empleada como control negativo (resultado no mostrado) por lo que se descartó por no mostrar una buena especificidad. Se decidió trabajar en paralelo con los aptámeros 9.3R y 9.10R como moléculas capturadoras.

A continuación, se procedió a seleccionar la mejor molécula detectora. Para ello, se realizó una nueva titulación empleando la proteína diana VP6 capturada con el aptámero 9.3R y la proteína empleada como control negativo, revelando el ensayo en paralelo con los dos anticuerpos monoclonales disponibles frente al PRVA: 1GH5 y 1JF10 marcados con peroxidasa [Figura IV.15].

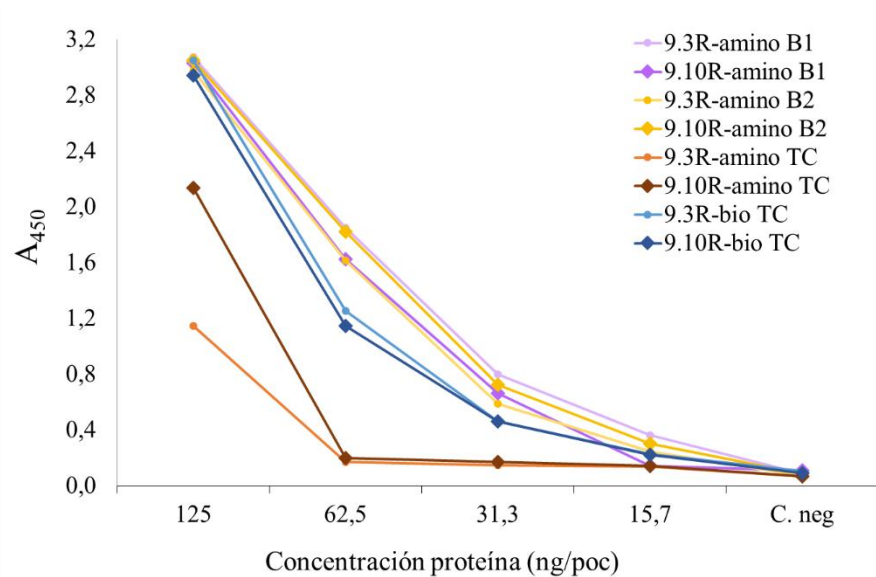
## Resultados



**FIGURA IV.15 | Evaluación AcMs frente a la VP6 en ELASA.** ELASA de PRVA empleando los dos AcMs específicos de la VP6 de PRVA como molécula detectora en combinación con el aptámero 9.3R como captador. El eje Y muestra los valores de Absorbancia a 450 nm y el eje X la concentración de proteína ensayada.

Como se observa en la Figura IV.15, la señal obtenida con la proteína recombinante VP6 capturada con el aptámero 9.3R y empleando como revelador el anticuerpo 1GH5 conjugado a peroxidasa, es superior tras solo 10 min de incubación con TMB a la señal obtenida a los 30 min de incubación cuando se empleó como revelador el AcM 1JF10, no observándose grandes diferencias en las señales obtenidas con la proteína empleada como control negativo. Por otro lado, se observa que al añadir 100 ng/pocillo (1  $\mu$ g/ml) de proteína la señal de Absorbancia obtenida es muy baja, no superando el 1,5 de intensidad. Por este motivo, para el desarrollo del ensayo ELASA se seleccionó como molécula reveladora el AcM 1GH5 conjugado a peroxidasa.

Empleando los dos candidatos mencionados, se ensayaron las distintas estrategias descritas en materiales y métodos para el recubrimiento de las placas de microtitulación. Brevemente, los aptámeros se modificaron en el extremo 5' mediante un grupo biotina para recubrir placas de estreptavidina o se modificaron en el extremo 5' mediante un grupo amino a través de un conector de 6 carbonos para recubrimiento de placas de poliestireno. Las mejores condiciones se determinaron seleccionando aquellas que mostraban un mayor límite de detección para la VP6 y que, a su vez, mostraban menores señales frente a la proteína empleada como control negativo, que se añadió a la máxima concentración ensayada para la VP6 (125 ng/pocillo). Los valores de Absorbancia obtenidos con las distintas concentraciones de proteína recombinante se muestran en la Figura IV.16.



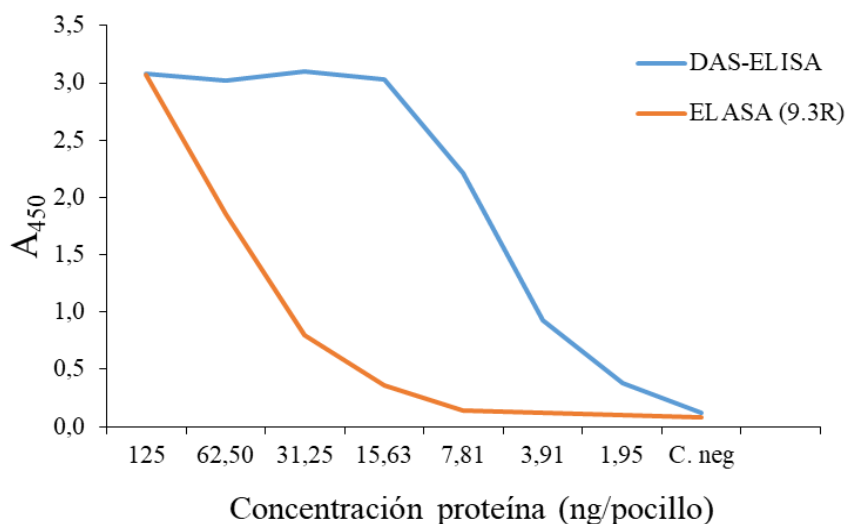
**FIGURA IV.16 | Evaluación de aptámeros de PRVA en ELASA.** Curva de titulación de proteína recombinante VP6 (AcBacPAK8) sobre los aptámeros capturadores 9.3R y 9.10R empleando distintas estrategias de recubrimiento: **B1**, aptámero amino en sciSPOT Oligo B1 sobre placas de poliestireno, **B2**, aptámero amino en sciSPOT Oligo B2 sobre placas de poliestireno y **TC**, aptámero biotina en tampón carbonato sobre placas de estreptavidina; en combinación con el AcM 1GH5-PO como revelador. El eje Y muestra los valores de Absorbancia a 450 nm y el X la concentración de proteína recombinante añadida a los pocillos.

Como se muestra en la figura anterior, la modificación de los aptámeros mediante un grupo amino y el recubrimiento de pocillos de placas de poliestireno empleando tampones específicos para el recubrimiento con moléculas de ADN (sciSPOT) es la aproximación que mejores resultados muestra, con mayores valores de  $A_{450}$  manteniendo fondos bajos en el control negativo. El tampón usado de forma habitual en la disolución de proteínas para el recubrimiento (tampón carbonato), no favorece la unión mediada por grupo amino de estas pequeñas moléculas a la superficie del pocillo, obteniendo señales de Absorbancia más bajas que en el resto de las combinaciones, que se pierden tras el primer punto de dilución. Sin embargo, al emplear aptámeros modificados con un grupo biotina y recubrir placas previamente tapizadas con estreptavidina, no se observaron diferencias entre el uso de tampón carbonato o el tampón específico para el recubrimiento con moléculas de ADN. En este caso concreto, la modificación de los aptámeros con un grupo biotina, muestra unos valores de  $A_{450}$  inferiores al uso de aptámeros modificados con un grupo amino, que hacen que con esta aproximación se obtenga un límite de detección de, aproximadamente, 150 ng/ml.

## Resultados

Como se aprecia en la figura, el aptámero 9.3R se ve favorecido al diluirle en tampón comercial sciSPOT Oligo B1 para el recubrimiento de placas mientras que el aptámero 9.10R se ve favorecido al emplear el tampón sciSPOT Oligo B2. En estas condiciones, ambos aptámeros muestran un límite de detección de, aproximadamente, 80 ng/ml.

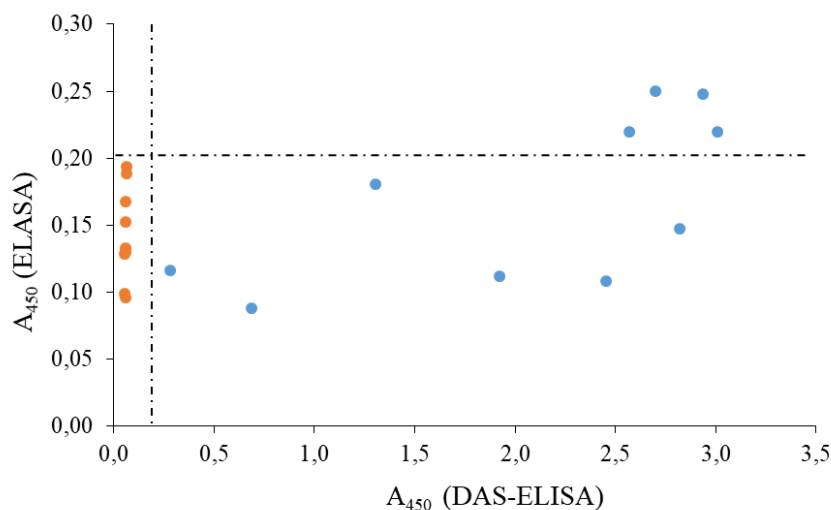
Una vez seleccionadas las mejores condiciones para la puesta a punto del ensayo tipo ELASA, la sensibilidad analítica se comparó con la obtenida empleando el ensayo DAS-ELISA comercial usado como referencia. Dado que tanto el aptámero 9.3R como el 9.10R mostraban una curva de titulación muy similar en sus condiciones óptimas, se decidió continuar trabajando con el aptámero 9.3R, ya que era el que había mostrado resultados más interesantes en experimentos previos. En la Figura IV.17 se observa claramente que, a pesar de la optimización llevada a cabo, el ensayo ELASA presenta una sensibilidad muy inferior al DAS-ELISA comercial para esta patología con la proteína recombinante, pasando de un límite de detección (último valor de concentración de proteína detectado) en el DAS-ELISA superior a 19 ng/ml (1,9 ng/pocillo), a los 80 ng/ml (7,81 ng/pocillo) obtenidos con el ELASA.



**FIGURA IV.17 | Comparación entre la sensibilidad analítica del ELASA y del DAS-ELISA de PRVA.** Curva de titulación de la proteína recombinante VP6 (AcBacPAK8) de PRVA estructurada en nanotúbulos mediante INgezim 11.RT.K1 y ELASA empleando el aptámero 9.3R como captador y el AcM 1GH5-PO como revelador.

Este resultado se comprobó analizando un pequeño grupo de muestras de heces obtenidas en campo: 10 muestras positivas y 10 muestras negativas caracterizadas

previamente en el CICAP mediante RT-qPCR. Las muestras se analizaron en paralelo empleando el DAS-ELISA comercial y el ELASA optimizado en el presente trabajo. Los resultados de Absorbancia a 450 nm obtenidos con cada uno de los ensayos para las muestras individuales se muestran en la Figura IV.18



**FIGURA IV.18 | Correlación entre ELASA y DAS-ELISA para detección de antígeno de PRVA.** Resultados de Absorbancia a 450 nm obtenidos para las muestras positivas (puntos azules) y negativas (puntos naranjas) de PRVA según la caracterización realizada por RT-qPCR obtenidos con el ensayo ELASA (Eje Y) y con el ensayo DAS-ELISA (Eje X). Las líneas discontinuas muestran el valor de Absorbancia empleado como punto de corte para ambos ensayos (0,2).

Mientras que el DAS-ELISA fue capaz de detectar todas las muestras positivas con un intervalo amplio de Absorbancias (0,4 - 3), el ELASA solo detectó 4 de las 10 muestras positivas evaluadas en el análisis. Aunque la especificidad mostrada por el ELASA era elevada, la sensibilidad obtenida fue de un 40 % comparada tanto con la técnica de referencia empleada en la caracterización de muestras de antígeno, RT-qPCR, como con el DAS-ELISA, como cabía esperar de la observación de las sensibilidades analíticas calculadas para los dos inmunoensayos. Así mismo, los resultados de A<sub>450</sub> de las muestras que dieron un resultado positivo con el ELASA fueron mucho más bajos que su correspondiente dato obtenido con el DAS-ELISA con unas señales que no llegaron a los 0,3 de Absorbancia en ningún caso para las muestras con mayor carga viral según el DAS-ELISA [Figura IV.18].



## IV. 2. Desarrollo de ensayos de detección de antígeno en muestras respiratorias empleando aptámeros

Como se ha comentado previamente, el complejo respiratorio porcino (PRDC) es uno de los problemas sanitarios más importantes que afectan a la industria porcina en todo el mundo, con una morbilidad entre el 10 y el 70 % y una mortalidad entre el 2 y el 20 %. Este síndrome rara vez se asocia con un único patógeno. Lo más habitual es encontrar sobreinfecciones con distintos microorganismos, unos primarios, que debilitan al animal, y otros, que establecen infecciones secundarias aprovechando el estado generado por la infección primaria. Por ello, su diagnóstico temprano es crucial para el control de la patología. Generalmente, los agentes más comunes que se encuentran en las granjas causando estas infecciones primarias son el virus Influenza porcino (SIV), *Mycoplasma hyopneumoniae*, circovirus porcino tipo 2 (PCV2) y el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) [10, 135]. Así mismo, las lesiones causadas por muchos de estos patógenos a nivel pulmonar son indistinguibles, por lo que es necesario acudir al diagnóstico laboratorial para aplicar el mejor tratamiento en cada caso [220].

Como referencia para la descripción de los métodos disponibles, se usó, entre otras fuentes, la web DISCONTTOOLS, una página desarrollada dentro de un proyecto colaborativo entre la comunidad investigadora, reguladores, organizaciones internacionales, veterinarios y granjeros para identificar las necesidades del sector ganadero en cuanto a herramientas de control de enfermedades infecciosas: diagnósticos, vacunas y productos farmacéuticos (accesible en línea en <https://www.discontools.eu/>). En DISCONTTOOLS se recoge información actualizada cada 5 años de un total de 53 patologías animales. En lo que respecta a las patologías respiratorias objeto de estudio, actualmente se dispone de técnicas de diagnóstico directo para todos estos patógenos entre los que se encuentra la RT-PCR o la PCR en función del material genómico del microorganismo, la inmunohistoquímica o inmunofluorescencia sobre secciones de tejido que únicamente puede realizarse en evaluaciones *post-mortem* y el aislamiento del agente patógeno bien en cultivo puro (*M. hyopneumoniae*) o bien sobre cultivo celular. Para los casos de *M. hyopneumoniae*, PRRSV y PCV2 no se dispone de métodos basados en la técnica ELISA para detectar antígeno en muestra, lo que dificulta el diagnóstico [198]. Mientras que para SIV se dispone de algunos ensayos de formato ELISA a nivel comercial cuyas sensibilidades presentan todavía margen para la mejora [198]. Por ese

## Resultados

motivo, ante las múltiples ventajas técnicas que los aptámeros ofrecen al diagnóstico en combinación con los anticuerpos, se decidió trabajar con estos 4 patógenos en el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos empleando la tecnología ELASA para proporcionar herramientas de aplicación sencilla para la identificación de estos patógenos.

En la Tabla IV.2 se resumen todas las tecnologías desarrolladas hasta la fecha para el diagnóstico directo de dichos patógeno, tanto a nivel comercial como recogidas en bibliografía y la técnica de referencia indicada por la autoridad competente, la OIE.

**TABLA IV.2 | Técnicas disponibles para el diagnóstico directo de los principales agentes causales de infección primaria en el complejo respiratorio porcino**

| Patógeno                       | PCR/RT-PCR                                     | Inmunoensayo                             | Aislamiento   | Otros                   | Gold-standard         |
|--------------------------------|--|--|---|-------------------------|-----------------------|
| <b>PRRSV</b>                   | RT-PCR   | IHC                                      | Sobre cultivo de Macrófagos alveolares porcinos                               | ISH                     | Aislamiento y tinción |
| <b>PCV2</b>                    | PCR múltiple con detección diferencial de PCV1 | IHC                                      | Sobre células PK15 y confirmación mediante PCR                                | ISH, Tipado             | IHC                   |
| <b>SIV</b>                     | RT-PCR   | DAS-ELISA <sup>(1)</sup> , IFA, IHC, LFA | Aislamiento por cultivo en distintas líneas celulares o inoculación de huevos | Tipado (PCR o HI + NI), | Aislamiento y tipado  |
| <b><i>M. hyopneumoniae</i></b> | PCR  | IHC                                      | Cultivo puro. Método costoso, fácilmente contaminable y lento                 | ISH                     | --                    |

IHC, Inmunohistoquímica. ISH, hibridación *in situ*. IFA, inmunofluorescencia. HI, inhibición de la hemaglutinación. NI, inhibición de la neuraminidasa.

(1) Ensayos comerciales disponibles: DEIA533Cal, Creative Diagnostics; KA1292, Abnova

## IV. 2. 1 Virus Influenza porcina (SIV)

Los virus Influenza que más habitualmente se encuentran infectando a ganado porcino son los virus Influenza A subtipo H1N1, H1N2 y H3N2. El diseño del diagnóstico de SIV se basó en el uso de la nucleoproteína de Influenza A, por ser la proteína más conservada dentro de estos virus [142]. Con esta aproximación, se busca un diagnóstico universal, sin diferenciar entre subtipos, de los virus Influenza porcinos más habituales. Sin embargo, es importante tener en consideración que, aunque de forma menos frecuente y no asociado a patología, la infección por el virus Influenza en porcino puede estar causada también por los virus Influenza B, C y D [221].

Los métodos ELISA para detección de antígeno de Influenza disponibles se encuentran en su mayoría optimizados para el uso de muestras humanas o aviares, y se basan en el reconocimiento específico de las proteínas H, N o NP. Estos ensayos han mostrado una sensibilidad para la detección de Influenza A del 67-71 % en los mejores casos con unas elevadas especificidades del 99-100 % [222]. Así mismo, para diagnóstico humano también se dispone de tests rápidos de detección de antígeno que muestran una sensibilidad moderada para la detección del patógeno [223].

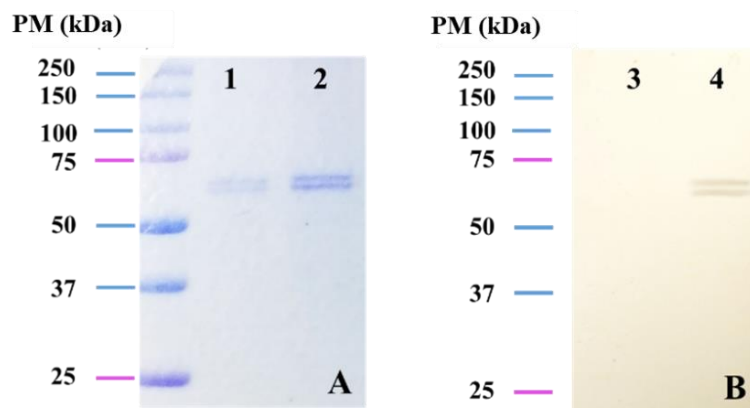
### IV. 2. 1. 1 Nucleoproteína SIV

Para el clonaje de la secuencia génica codificante de la NP de Influenza A, se empleó como material de partida el inóculo de Influenza A/PR8/1934 (H1N1) que se amplificó sobre cultivo de células MDCK. El ARN genómico viral se aisló y la secuencia codificante de la NP se amplificó mediante RT-PCR. En la amplificación se modificó el extremo 5' del gen mediante la introducción de los nucleótidos codificantes de un péptido de fusión de 6 histidinas (6xHis) en el oligonucleótido directo, como se muestra en la Tabla III.2. Este péptido de fusión facilitó el seguimiento de la proteína recombinante y su posterior purificación por cromatografía de afinidad. Tras la reacción de amplificación, los productos de PCR se resolvieron mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8 %, obteniéndose una única banda que se correspondía con el tamaño esperado, considerando que el gen codificante de la nucleoproteína era de 1548 pb (resultado no mostrado). El producto de PCR purificado se clonó en el plásmido de clonaje del sistema Gateway, pCR8/TOPO/GW y, tras comprobar la secuencia de éste por secuenciación, se subclonó en el plásmido de transferencia pAcGP67/GW para la expresión extracelular de la NP en células de insecto.

## Resultados

Siguiendo el mismo flujo de trabajo descrito en el apartado anterior, se obtuvieron clones aislados de baculovirus recombinantes AcGP67+6xHis-NP por cotransfección en células de insecto Sf9 y posterior aislamiento y selección de clones.

La proteína se expresó de forma extracelular a partir de baculovirus recombinantes AcGP67+6xHis-NP. Se estableció la infección de cultivos de células Sf900, adaptadas a crecer en medio sin suero, a  $1 \times 10^6$  cel/ml con una MDI de 0,1 ufp/ml y recogida a las 96 h post-infección, como condiciones óptimas para la expresión. La proteína se obtuvo en el medio de cultivo, de modo que se clarificó por centrifugación y la NP se purificó mediante columnas de níquel, específicas por el péptido de fusión 6xHis. Una vez purificada, la proteína se analizó mediante SDS-PAGE y posterior tinción con azul de Coomassie y *western blot* para evaluar la calidad de la proteína obtenida en cuanto a pureza e inmunogenicidad. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura IV.19.



**FIGURA IV.19 | Análisis mediante SDS-PAGE de la NP de SIV, y posterior evaluación mediante A. Tinción con azul de Coomassie de 0,5  $\mu$ g (1) y 1  $\mu$ g (2) de NP respectivamente, y B. *western blot* de 0,5  $\mu$ g de la proteína NP (4) empleando un anticuerpo monoclonal específico de la NP de Influenza A (AcM 3CG5) y empleando como control negativo la proteína P46 de *M. hyopneumoniae* (3).**

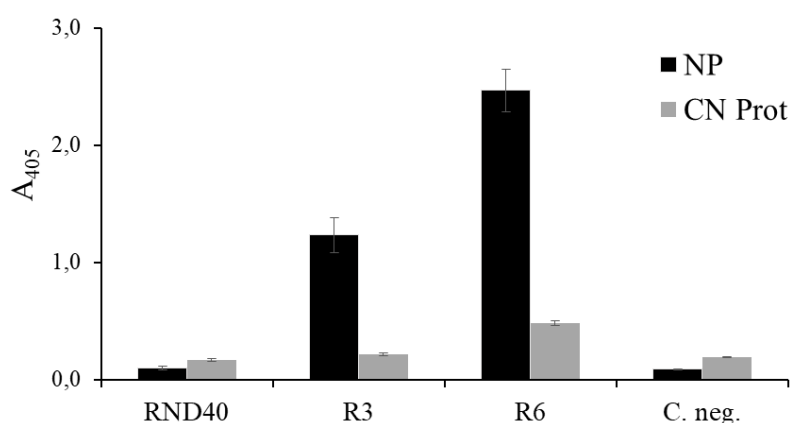
Como puede observarse en la Figura IV.19A, la NP expresada extracelularmente muestra una doble banda tras su purificación en el análisis por SDS-PAGE y posterior tinción con azul de Coomassie. Mediante *western blot* se determinó que las dos bandas obtenidas eran reconocidas de forma específica por el AcM específico 3CG [Figura IV.19B], por lo que se trataba de la NP de Influenza A y no de una proteína contaminante. Tras confirmar la naturaleza de la doble banda obtenida, se estableció una pureza muy elevada para la 6xHis-NP producida. La proteína se cuantificó por densitometría en base

a una curva de BSA estableciéndose una concentración de 0,4 mg/ml y un rendimiento total de 3 mg de proteína por  $1 \times 10^8$  células Sf900 infectadas.

#### IV. 2. 1. 2 Selección de aptámeros

La NP recombinante se empleó como molde para la selección de aptámeros específicos. Para ello, como se describe en el apartado II.2.9.1, la proteína se capturó en placas de microtitulación a través del anticuerpo monoclonal 3DH6 y para cada ronda de selección se emplearon 3 pocillos con 33 pmol de proteína capturada en cada uno de ellos. En total fue necesario realizar 6 rondas de selección y 2 rondas de contraselección para obtener una selectividad suficiente en el ensayo ELONA por la proteína de interés.

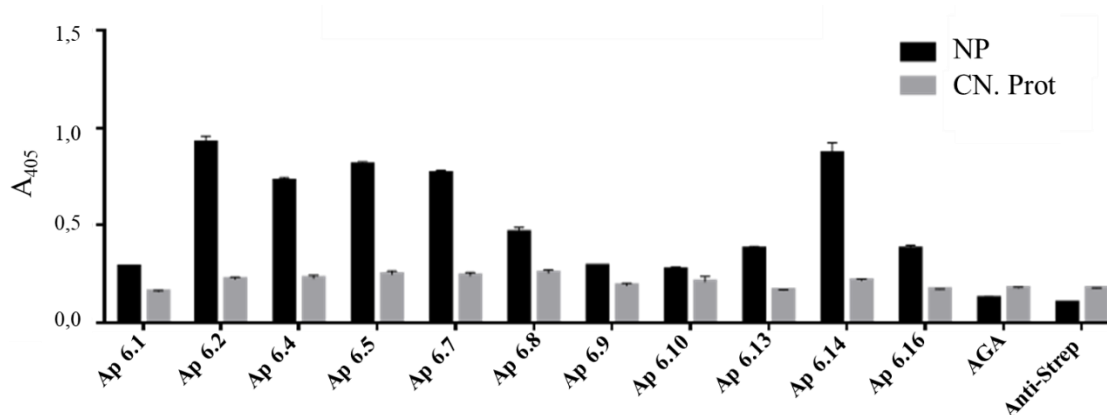
Los aptámeros de las distintas rondas de selección se marcaron con digoxigenina mediante PCR empleando oligonucleótidos marcados y la respuesta de las distintas poblaciones se evaluó mediante ELONA. Para ello se incubaron los pocillos con la proteína capturada y una proteína negativa con los aptámeros marcados, seguido de una etapa de incubación con un AcM anti-digoxigenina marcado con peroxidasa. Como se muestra en la Figura IV.20, tras la sexta ronda de selección empleando la metodología SELEX, la población obtenida exhibió una señal de  $A_{405}$  en los pocillos con la NP capturada 25 veces superior que la población de la RND40 incubada frente a los mismos pocillos y 6 veces superior a la señal obtenida de la incubación de la ronda 6 marcada con los pocillos tapizados con la proteína de control negativo, BSA.



**FIGURA IV.20 | Evaluación de poblaciones SELEX frente a la NP de SIV mediante ELONA** Señal media de  $A_{405}$  ( $\pm$ SD) obtenida en ELONA frente a la NP de influenza A tras las rondas 3 (R3) y 6 (R6) del proceso SELEX de selección, así como de la población inicial RND40, previamente marcada con estreptavidina. Como proteína negativa se incluyó BSA (CN Prot). Como control negativo, los pocillos se incubaron en ausencia de aptámeros.

## Resultados



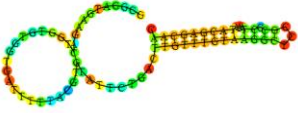
De este modo se seleccionó la población obtenida en ronda 6 para el clonaje de las secuencias de aptámeros. Los clones aislados se marcaron en ambas cadenas con oligonucleótidos marcados con biotina y su respuesta se evaluó en ELONA. Como se muestra en la Figura IV.21, ciertos clones exhibieron una señal de Absorbancia superior con la proteína diana, NP, que con la proteína empleada como control negativo en las incubaciones, BSA. Los que mejores comportamientos exhibieron fueron los clones: 6.2, 6.4, 6.5, 6.7 y 6.14. Así mismo, las señales negativas de los distintos aptámeros se mostraron al nivel de los controles introducidos: incubación con el aptámero AGA que, por su secuencia de bases nitrogenadas (AG)<sub>38</sub>, no presenta la capacidad de formar puentes de hidrógeno entre bases y, por ello, no formará estructuras terciarias. Así como, en ausencia de aptámeros, únicamente incubando con estreptavidina marcada con peroxidasa.



**FIGURA IV.21 | ELONA de clones de aptámeros aislados frente a la NP de SIV.** Valores de Absorbancia ( $\pm$ SD) obtenidos en ensayo ELONA frente a la NP de SIV y la proteína empleada como control negativo, BSA (CN. Prot) empleando aptámeros aislados marcados en ambas cadenas con estreptavidina. Como controles negativos se introdujeron el aptámero AGA y pocillos que se incubaron en ausencia de aptámeros.

Tras evaluar las secuencias de los distintos aptámeros, se determinó que los clones 6.2, 6.4 y 6.7 eran la misma molécula, ya que presentaban una secuencia idéntica. Los clones 6.2, 6.5 y 6.14 se marcaron de forma diferencial en las cadenas directa (F) y reversa (R) y los mejores candidatos obtenidos en ese ensayo (6.2R, 6.2F y 6.14F) se sintetizaron químicamente marcados con digoxigenina para la caracterización de los mismos.

En la siguiente tabla se recogen las principales características de los aptámeros seleccionados.

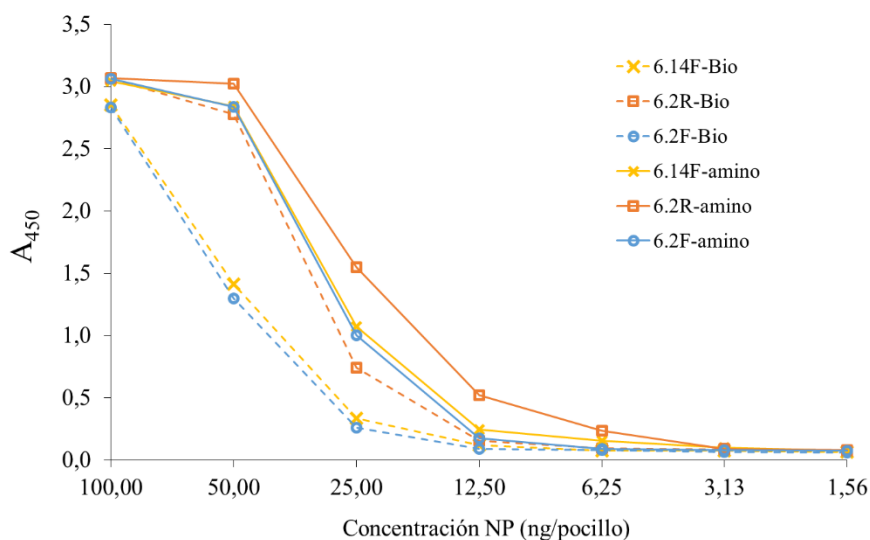
| TABLA IV.3   Características de los aptámeros seleccionados frente a la NP de SIV (media $\pm$ SD) |   |                   |                          |
|--|---|-------------------|--------------------------|
| Nombre   | Estructura  | Kd (nM)           | Bmax (A <sub>405</sub> ) |
| Ap 6.2F  |  | 2.597 $\pm$ 0.890 | 0.866 $\pm$ 0.036        |
| Ap 6.2R  |  | 4.388 $\pm$ 1.887 | 1.314 $\pm$ 0.077        |
| Ap 6.14F   |  | 3.674 $\pm$ 0.866 | 1.092 $\pm$ 0.034        |

Todos los aptámeros seleccionados mostraron buenos parámetros de afinidad por la NP de SIV como se muestra en la Tabla IV.3, con constantes de disociación (Kd) del orden nanomolar en todos los casos. Los mejores parámetros de afinidad se obtuvieron con el aptámero 6.2F que exhibe la menor Kd. Así mismo, los aptámeros seleccionados muestran una Absorbancia máxima para los 100 ng de proteína empleados de alrededor de 1 para todos ellos, siendo el que mayores valores teóricos de Absorbancia presenta el Ap 6.2R.

Seguidamente, empleando el software RNAfold se realizó la predicción estructural de los aptámeros seleccionados que se muestra en la Tabla IV.3. La escala de color indica la probabilidad de formación de puentes de hidrógeno entre bases, asociando los colores cálidos (rojo, naranja y amarillo) con una mayor probabilidad de formación que los colores fríos (azul y verde). Como se muestra en las figuras anteriores, los tres aptámeros presentan regiones con alta probabilidad de formar uniones de pares de bases entre sí. El aptámero 6.2F muestra la posibilidad de formar una estructura G-cuádruple de acuerdo con su secuencia formada por 4 pares de guaninas situadas próximas en la disposición tridimensional. Esta estructura confiere una mayor estabilidad y protección frente a la degradación, haciéndola más estable que el resto.

### IV. 2. 1. 3 Desarrollo de ensayos ELASA

Con los tres aptámeros seleccionados se procedió a la optimización de ensayos ELASA para la detección de antígeno. En primer lugar, se determinaron las mejores condiciones para el recubrimiento de placas. Para ello, las distintas moléculas de ADN se sintetizaron químicamente marcadas con un grupo biotina o amino en su extremo 5' y con ellas se recubrieron pocillos de placas de microtitulación de estreptavidina y poliestireno de alta capacidad de unión respectivamente. Los aptámeros se añadieron a una concentración saturante para el recubrimiento y sobre esos pocillos se añadieron cantidades decrecientes de la NP recombinante. Para revelar el ensayo se añadió el AcM 3DH6 marcado con peroxidasa. Los resultados de Absorbancia a 450 nm en función de la concentración de proteína añadida se muestran en la Figura IV.22. Se estableció como límite de detección, la menor concentración de proteína que dio una señal de Absorbancia dos veces superior a la señal obtenida con el control negativo (VP6 de PRVA obtenida en el mismo sistema).



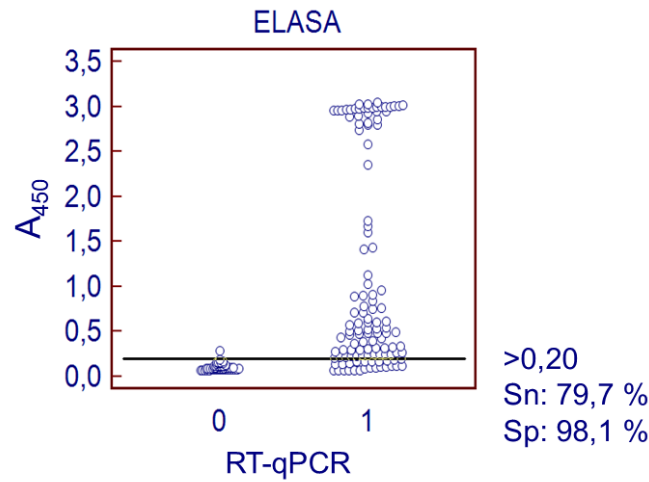
**FIGURA IV.22 | Selección de condiciones óptimas para el ELASA de SIV.** Curva de titulación de la proteína recombinante NP sobre placas de microtitulación recubiertas con los distintos aptámeros disponibles acudiendo a distintas estrategias: --- modificación de los aptámeros con grupo biotina y recubrimiento de placas de estreptavidina o – modificación de los aptámeros con un grupo amino y recubrimiento de placas de poliestireno.

En el caso de los aptámeros específicos frente a la NP de SIV, no se observaron diferencias al usar los distintos tampones específicos para el recubrimiento de placas con moléculas de ADN (sciSPOT Oligo B1 y B2) al recubrir los pocillos de placas de

microtitulación de poliestireno. Por este motivo, en la Figura IV.22 solo se muestran los resultados obtenidos con el tampón sciSPOT Oligo B1. De la observación de la figura, se deduce que la modificación de los aptámeros con un grupo amino da mejores resultados con las moléculas ensayadas, obteniéndose valores de  $A_{450}$  muy superiores para todos los aptámeros. Así mismo, en ambos casos, el aptámero 6.2R muestra un mayor límite de detección que el resto de aptámeros ensayados, así como un mayor Absorbancia a 450 nm para todos los puntos. Los aptámeros 6.2F y 6.14F mostraron unas curvas de titulación muy similares. De acuerdo con estos resultados, se seleccionó el aptámero 6.2R-amino como el mejor candidato para el desarrollo de ensayos diagnósticos, obteniéndose una sensibilidad analítica de 62,5 ng/ml.

Ante estos resultados, se procedió a optimizar los distintos parámetros del ensayo. En primer lugar, se estableció la concentración óptima de recubrimiento de placas del aptámero capturador, realizando una titulación del aptámero desde la concentración de 500 nM hasta 3 nM para el recubrimiento de placas. La NP recombinante se añadió sobre los pocillos a la concentración establecida como límite de detección; 62,5 ng/ml, para establecer la concentración mínima de aptámero requerida para obtener dicha sensibilidad analítica (resultado no mostrado). Se establecieron como condiciones óptimas el recubrimiento de placas de poliestireno con el aptámero 6.2R-amino a una concentración de 60 nM en tampón sciSPOT Oligo B1. Así mismo, se optimizó la concentración del anticuerpo monoclonal 3DH6 conjugado a peroxidasa (1/5.000) y de extracción de muestras, que se fijó en la dilución 1:2 en tampón de ensayo por ser las condiciones más reproducibles y que mayor sensibilidad mostraban.

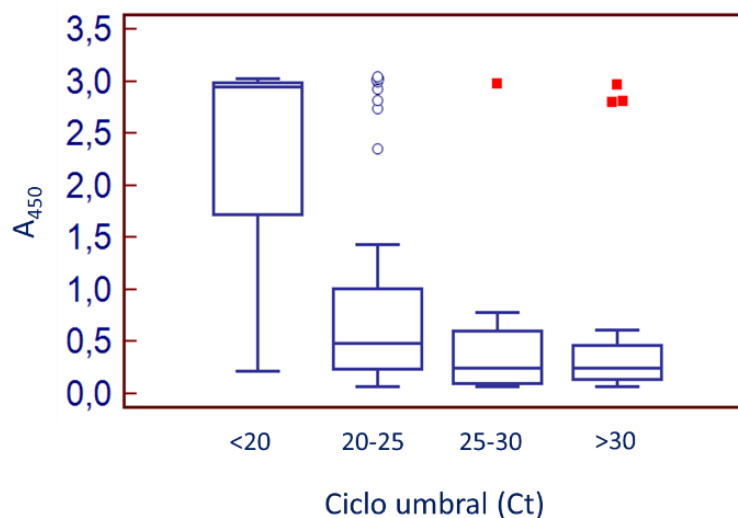
En estas condiciones se procedió al análisis de un total de 171 muestras de hisopos nasales de campo previamente caracterizadas en la Universidad Autónoma de Barcelona por qRT-PCR. Los resultados obtenidos se analizaron empleando el software MedCalc mediante curva ROC para establecer el punto de corte con el que se obtuvieran los mejores resultados de sensibilidad y especificidad [Figura IV.23].



**FIGURA IV.23 | Análisis mediante curva ROC de los resultados del ELASA SIV.** Diagrama de puntos en que se muestran los valores de  $A_{450}$  obtenidos mediante el ensayo ELASA con las distintas muestras caracterizadas mediante RT-qPCR como positivas (1) y negativas (0).

Como se muestra en la figura anterior, el mejor punto de corte para el ensayo se estableció en 0,2 de Absorbancia a 450 nm. Con este punto de corte, se obtuvo un valor de sensibilidad cercano al 80 %, detectando 94 muestras de las 118 clasificadas como positivas con la técnica de referencia RT-qPCR, lo cual es un buen parámetro comparado con las técnicas disponibles, y una especificidad del 98,1 % obteniéndose un único resultado falso positivo ( $n = 53$ ).

Para evaluar de forma más descriptiva los parámetros diagnósticos del ensayo desarrollado, las muestras se clasificaron en 4 grupos en función del valor de ciclo límite (Ct) obtenido en la clasificación de muestras mediante la técnica de referencia y los distintos grupos se evaluaron mediante diagrama de cajas que se muestra en la Figura IV.24.



**FIGURA IV.24 | Diagrama de cajas de las muestras de SIV analizadas mediante ELASA.** Mediana y percentiles de los valores de A<sub>450</sub> obtenidos mediante ELASA, para cada grupo de muestras, estratificadas en función de su valor de Ct por RT-qPCR en: <20, 20-25, 25-30 y >30.

Aunque no se observó una correlación directa entre la señal de A<sub>450</sub> obtenida en el ELASA y el ciclo de amplificación por encima del punto de corte (Ct) de la RT-qPCR, con un coeficiente de correlación de  $R=-0,561$ , sí que se aprecia cierta tendencia en las señales de Absorbancia y una buena correlación entre técnicas con un valor para la kappa de Cohen de 0,695. A medida que disminuye el Ct de las muestras agrupadas, se aprecia un aumento en la mediana de Absorbancia del grupo, que se hace especialmente evidente para las muestras de grupo de  $Ct < 20$ . Ninguna muestra del grupo de  $Ct < 20$  dio un resultado negativo con el ensayo ELASA desarrollado, observándose un aumento en el número de muestras cuyo valor de Absorbancia era de 3. En el grupo de muestras de Ct comprendida entre 20 y 25, se detectó más de un 80 % de las muestras como positivas (35/43). Este porcentaje se redujo en los siguientes grupos con un 63 % de positivos (12/19) en el grupo de Ct comprendida entre 25 y 30 y un 55 % (11/20) entre las muestras de Ct mayor a 30.

Ante los buenos resultados obtenidos con este ensayo ELASA para detectar antígeno de SIV en hisopos nasales, se decidió preparar un prototipo para su evaluación. Para ello, se prepararon 3 kits idénticos conteniendo las placas recubiertas con los aptámeros, el anticuerpo monoclonal marcado con peroxidasa, los controles y el tampón de ensayo y se evaluó la reproducibilidad de estos ensayos [Tabla IV.4].

| TABLA IV.4   Características del ELASA para detección de antígeno de SIV |       |                              |                   |                           |            |                    |                    |
|--|-------|------------------------------|-------------------|---------------------------|------------|--------------------|--------------------|
|  |       | Media<br>(A <sub>450</sub> ) | Desv.<br>estándar | Coeficiente variación (%) |            | Límite<br>inferior | Límite<br>superior |
|  |       |                              |                   | intraplaca                | interplaca |                    |                    |
| Control<br>positivo  | ( 1 ) | 3,024                        | 0,037             | 1,21                      |            | 2,993              | 3,034              |
|  | ( 2 ) | 3,012                        | 0,014             |                           | 0,46       | 2,979              | 3,062              |
| Control<br>negativo  | ( 1 ) | 0,069                        | 0,003             | 3,82                      |            | 0,067              | 0,074              |
|  | ( 2 ) | 0,068                        | 0,002             |                           | 3,48       | 0,065              | 0,071              |

(1) Datos obtenidos en 8 pocillos obtenidos de la misma placa

(2) Datos obtenidos en 7 pocillos de distintas placas

Como se muestra en la Tabla IV.4, los coeficientes de variación obtenidos tanto para los controles positivos como para los negativos, dentro de una misma placa o entre dos placas distintas, muestran valores inferiores al 4 %, por lo que se consideró que el ensayo mostraba una buena reproducibilidad.

La evaluación del ELASA se realizó en paralelo en los tres centros que participaban dentro del proyecto E1011!: Ingenasa, Universidad autónoma de Barcelona (UAB) y Centro Tecnológico Agroalimentario – Pozoblanco (CICAP), empleando el mismo grupo de muestras y los mismos prototipos en paralelo [Tabla IV.5].

| TABLA IV.5   Valores de sensibilidad y especificidad obtenidos en el ensayo interlaboratorio para el ELASA de SIV desarrollado |         |         |          |
|--|---------|---------|----------|
|  | UAB     | CICAP   | Ingenasa |
| <b>Sensibilidad</b>  | 73,68 % | 68,42 % | 89,47 %  |
| <b>Especificidad</b>   | 98,00 % | 98,00 % | 98,00 %  |

Con el ensayo interlaboratorio se obtuvo una especificidad en los tres casos del 98 % y una sensibilidad con variaciones entre los distintos laboratorios del 68,42 % - 89,47 %. Lo que se consideraron buenos parámetros para la aplicación del prototipo. El ensayo ELASA desarrollado mostró una correlación moderada con la técnica empleada como referencia, RT-qPCR ( $\kappa=0,59$ ) y una buena correlación en los resultados obtenidos entre los distintos laboratorios ( $\kappa=0,78$ ).

## IV. 2. 2 *Mycoplasma hyopneumoniae*

*Mycoplasma hyopneumoniae* es el principal patógeno causante de la neumonía enzoótica y, como se ha explicado previamente, uno de los principales agentes primarios del complejo respiratorio porcino. Al no tratarse de una enfermedad de declaración obligatoria no se dispone de datos oficiales sobre los casos en cada país, aunque se conoce que su distribución es global y que presenta una prevalencia elevada, observándose una prevalencia del 30-80 % a nivel mundial. Entre todas las proteínas antigénicas de esta bacteria, la proteína P46 ha mostrado ser específica de especie y con bajos niveles de reactividades cruzadas con otros *Mycoplasma* que pueden encontrarse en el cerdo como *M. flocculare* y *M. hyorhinis* [146, 149].

El aislamiento bacteriano continúa siendo el método de referencia (*gold-standard*) para la detección de *M. hyopneumoniae*, a pesar de requerir de unos medios muy especializados y presentar importantes problemas de sobrecrecimiento de otras bacterias que pueden llegar a enmascarar la infección. Otras técnicas habitualmente empleadas para la detección de este patógeno son la inmunohistoquímica, la hibridación *in situ* y la PCR, que presenta una mayor sensibilidad en muestras obtenidas de tejido o del tracto respiratorio bajo (faringe, tráquea, bronquios y bronquiolos) que con muestras orales, pero hasta la fecha no se dispone de técnicas en formato ELISA que faciliten la detección directa del patógeno de forma rápida [146, 220].

### IV. 2. 2. 1 Proteína P46 *M. hyopneumoniae*

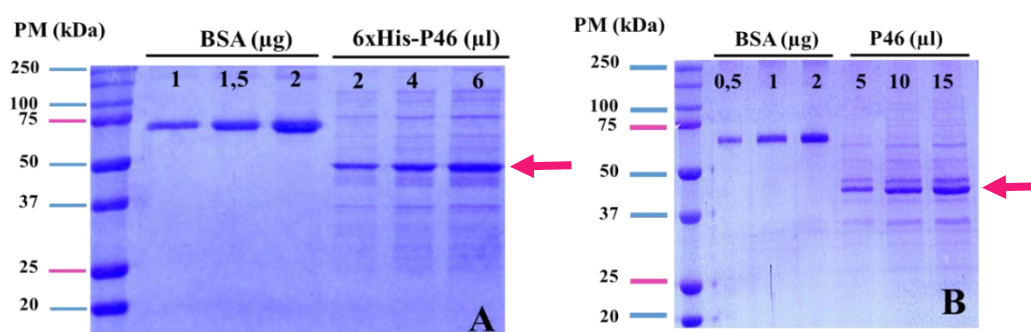
El gen codificante para la proteína P46 de *M. hyopneumoniae* no pudo amplificarse por PCR convencional a partir del ADN genómico debido al uso de codones de la bacteria. El triplete “TGA” que en el código universal codifica un codón de parada, en esta bacteria codifica por un codón de Trp. De acuerdo a la secuencia obtenida de GenBank (AY496280.1), el gen codificante de la proteína P46 de *M. hyopneumoniae* incluía 3 tripletes “TGA” en las posiciones 208 nt, 301 nt y 760 nt que forzarían la parada de la traducción, dando paso a una proteína truncada, por lo que se decidió adquirir un gen sintético [148]. Dado que el sistema de expresión seleccionado para la producción de la P46 fue el sistema de expresión en células de insecto empleando baculovirus recombinantes, la secuencia génica codificante de la P46 se adaptó al uso de codones de *Spodoptera frugiperda*.

## Resultados

El gen obtenido de forma sintética se clonó directamente en el plásmido de clonaje del sistema Gateway pCR8/TOPO/GW y se subclonó en el plásmido de expresión pDEST17, para expresión en el sistema de *E. coli* fusionada a un péptido de fusión de 6 histidinas (6xHis), y en el plásmido de transferencia pBacPAK8/GW, para expresión en células de insecto empleando el sistema de baculovirus recombinantes.

Para la producción de esta proteína en el sistema de *E. coli*, se fijaron como condiciones óptimas la recogida del cultivo a 3 h post-inducción con arabinosa. La proteína se obtuvo en la fracción soluble de las bacterias, de modo que se purificó mediante columnas de afinidad del péptido de fusión, obteniéndose una proteína semipurificada a una concentración de 0,15 mg/ml [Figura IV.25A]. El rendimiento total obtenido para esta proteína, cuyo peso molecular teórico es de 48,5 kDa, fue de 0,75 mg por 100 ml de cultivo.

Por otro lado, la proteína P46 se expresó de forma intracelular en células de insecto Sf9 con baculovirus recombinantes AcBacPAK8/GW+P46. Las condiciones óptimas se establecieron en la infección de células Sf9 a una densidad de  $1 \times 10^6$  cel/ml, a una MDI de 1 ufp/cel y recogida a las 72 h post-infección. La proteína se obtuvo en la fracción celular soluble, de modo que se purificó mediante columna de afinidad empleando el AcM 1B9H1. La proteína de 46 kDa se obtuvo semipurificada a una concentración de 0,25 mg/ml [Figura IV.25B], obteniendo un rendimiento de 1 mg de proteína por  $1 \times 10^8$  células infectadas.



**FIGURA IV.25 | Análisis mediante SDS-PAGE de la proteína P46 de *M. hyopneumoniae* y posterior tinción con azul de Coomassie de la proteína producida en células de *E. coli* (A) o de insecto (B) y purificadas mediante cromatografía de afinidad. Cuantificación mediante densitometría en base a curva de BSA.**

Ambas proteínas fueron reconocidas de forma específica en *western blot* y ELISA indirecto por el AcM 1B9H1 específico frente a la proteína P46 de *M. hyopneumoniae*,

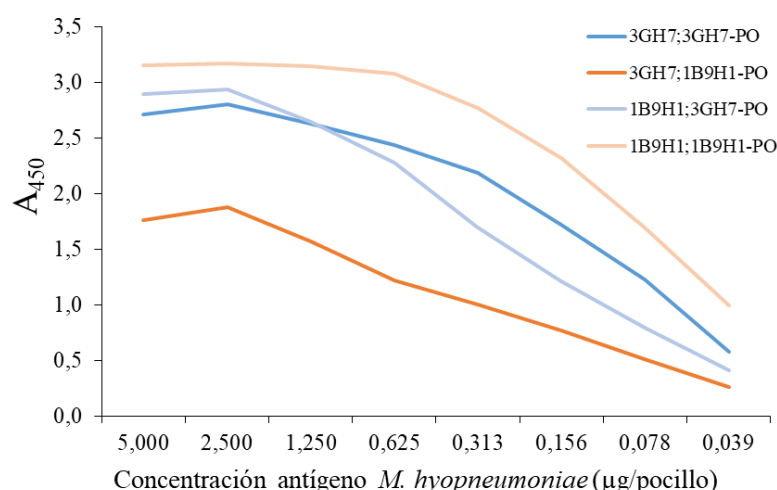
mostrando un menor límite de detección para la proteína obtenida en bacterias, que mostró una mejor respuesta biológica (resultado no mostrado).

#### IV. 2. 2. 2 Desarrollo de ensayos DAS-ELISA

En primer lugar, con los anticuerpos monoclonales disponibles en el laboratorio y los nuevos antígenos recombinantes obtenidos, se trabajó en el desarrollo de ensayos tipo ELISA sándwich de doble anticuerpo (DAS-ELISA).

Los distintos anticuerpos monoclonales se emplearon para recubrir los pocillos de placas de microtitulación de poliestireno a una concentración saturante (1  $\mu\text{g/pocillo}$ ). Sobre los pocillos se añadió el antígeno recombinante de interés, en dilución seriada para determinar el límite de detección de cada pareja de anticuerpos. Para revelar el ensayo se añadieron los distintos anticuerpos marcados con peroxidasa.

Como se observa en la Figura IV.26, la mejor combinación de anticuerpos para el desarrollo de un ensayo diagnóstico fue empleando el anticuerpo monoclonal 1B9H1 como capturador y revelador, por ser la combinación que mayores valores de Absorbancia mostraba con el antígeno inactivado de *M. hyopneumoniae*, probando así la capacidad del ensayo de reconocer al antígeno en su estructura nativa. Al realizar la determinación del límite de detección del ensayo con la proteína recombinante obtenida en *E. coli*, se obtuvo un valor de 20 ng/ml de sensibilidad analítica.

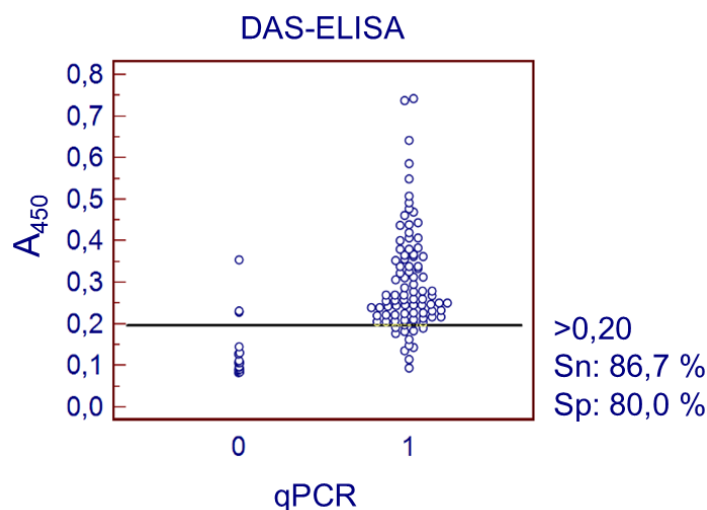


**FIGURA IV.26 | Evaluación de AcMs de *M. hyopneumoniae* en DAS-ELISA.** Curvas de titulación del antígeno inactivado de *M. hyopneumoniae* mediante DAS-ELISA empleando distintas combinaciones de anticuerpo capturador y revelador. El eje X muestra la concentración de antígeno añadido sobre los distintos pocillos. El eje Y muestra las señales de  $A_{450}$  obtenidas para cada punto con las distintas combinaciones.

## Resultados

Puesto que *M. hyopneumoniae* es un patógeno intracelular que no llega a romper la membrana de la célula en su ciclo, para detectar el agente en muestras obtenidas del tracto respiratorio fue necesario en primer lugar establecer un protocolo de procesamiento que permitiera lisar las células contenidas en la muestra. Para ello, se ensayaron tampones con distintas composiciones que incluyeran detergentes y otros compuestos que favorecieran la ruptura entre sus componentes. Sin embargo, ninguno de ellos fue suficiente para alcanzar el grado de ruptura conseguido mediante métodos mecánicos como la sonicación o la incubación en presencia de bolas de circonio. Para el análisis, las muestras de campo fueron sonicadas durante 30 s en hielo y se diluyeron 1:1 en tampón de ensayo descrito en la Tabla III.5 de materiales y métodos, antes de añadirlas sobre el pocillo de la placa de microtitulación. Alternativamente, la sonicación podía ser sustituida por adición de la muestra diluida 1:1 en tampón de ensayo sobre microesferas de circonio e incubación durante 30 s en vortex.

Las muestras se sometieron al tratamiento descrito y se analizaron con el DAS-ELISA desarrollado. En total se analizaron 105 muestras de hisopos traqueobronquiales y lavados broncoalveolares de los cuales 90 habían sido caracterizados previamente como positivos con la técnica empleada como referencia, la qPCR. Los resultados obtenidos para cada muestra con el DAS-ELISA se sometieron a un análisis de curva ROC para establecer el mejor punto de corte [Figura IV.27].

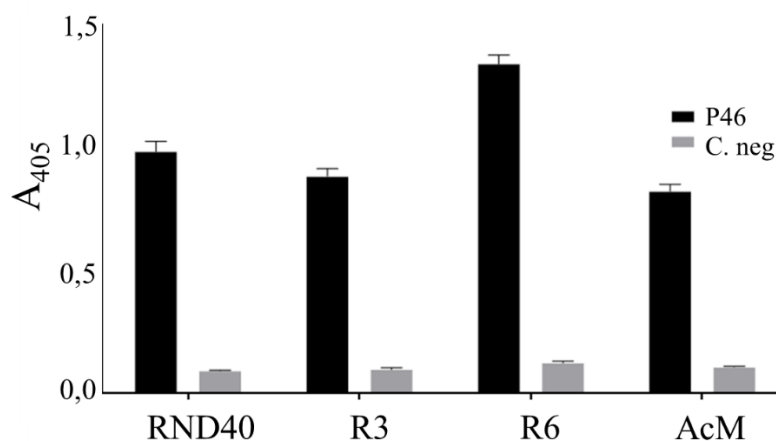


**FIGURA IV.27 | Análisis mediante curva ROC de los resultados del DAS-ELISA de *M. hyopneumoniae*.** Diagrama de puntos en que se muestran los valores de A<sub>450</sub> obtenidos mediante el ensayo DAS-ELISA con las distintas muestras caracterizadas mediante qPCR en positivas (1) y negativas (0) a *M. hyopneumoniae*.

Como se muestra en la figura anterior, el punto de corte óptimo para el ensayo se definió como 0,2 de  $A_{450}$ , con valores de Absorbancia comprendidos entre 0,2 y 0,8. En estas condiciones, el ensayo presenta una sensibilidad del 86,7 %, detectando 12 falsos negativos entre las 90 muestras positivas analizadas, y una especificidad del 80 % con tres falsos positivos entre las 15 muestras negativas analizadas.

#### IV. 2. 2. 3 Selección de aptámeros

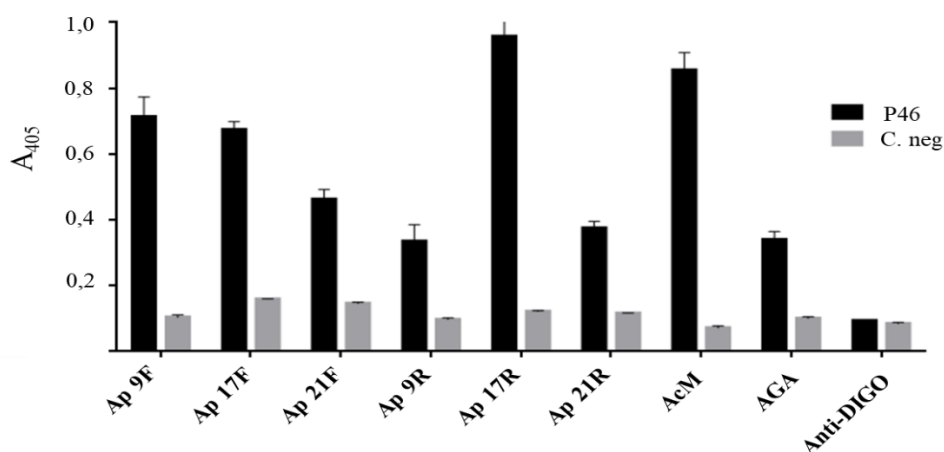
La selección de aptámeros se realizó empleando como proteína diana la proteína obtenida en células de *E. coli*, por obtenerse con mayor grado de pureza y ser reconocida de forma más eficiente por el AcM 1B9H1 en ELISA indirecto. La proteína se capturó en pocillos de una placa de microtitulación mediante el recubrimiento de los mismos con el AcM 1B9H1. Para la selección de aptámeros, las distintas poblaciones obtenidas en las rondas de selección se incubaron con 100 pmol de proteína P46 recombinante. En total fue necesario realizar 6 rondas de selección siguiendo el protocolo SELEX con dos rondas de contraselección previas a la tercera y a la sexta ronda de selección, incubando las poblaciones con el mismo número de pocillos recubiertos con el AcM 1B9H1 en ausencia de la proteína recombinante de interés. Tras las rondas 3 y 6, las poblaciones se marcaron con digoxigenina para evaluar su respuesta en ELONA [Figura IV.28].



**FIGURA IV.28 | Evaluación de poblaciones SELEX frente a la P46 de *M. hyopneumoniae* mediante ELONA.** Se representa la Absorbancia a 405 nm ( $\pm$ SD) mediante ELONA de las poblaciones de aptámeros obtenidas tras la ronda 3 (R3) y la ronda 6 (R6) de selección mediante SELEX frente a la población de partida RND40. Como control negativo, todas las poblaciones se incubaron en paralelo con una proteína negativa, BSA. Como control positivo, los pocillos se incubaron con el AcM 1B9H1 marcado con peroxidasa.

## Resultados

Como se observa en la Figura IV.28, la señal obtenida en ELONA con la población de la ronda 3 se redujo con respecto a la de la ronda RND40, no observándose evolución en la selección. La población obtenida tras la ronda 6 mostró una señal de Absorbancia 13 veces superior por la proteína diana P46 que la obtenida con BSA, la proteína empleada como control negativo. Dado que la población de partida RND40, mostró una señal de Absorbancia elevada, cercana a 1 de  $A_{405}$ , la señal de la ronda 6 no llegó a ser el doble de la obtenida con la población inicial, pero mostró un aumento de la especificidad por la P46 con respecto a la ronda 3 y RND40. Ante estas observaciones, la población de ronda 6 se clonó para aislar clones de aptámeros. Los aptámeros aislados se evaluaron mediante ELONA, seleccionando como mejores candidatos a los clones 9, 17 y 21 que se marcaron de forma diferencial en la cadena directa y reversa [Figura IV.29].


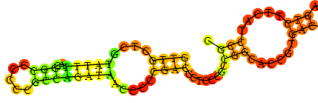
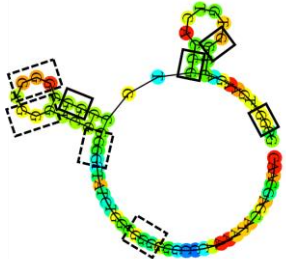


**FIGURA IV.29 | Evaluación mediante ELONA de clones de aptámeros aislados frente a la proteína P46.** Señal de Absorbancia a 405 nm ( $\pm$ SD) obtenida mediante ELONA de los clones aislados de aptámeros marcando de forma diferencial la cadena directa (F) y reversa (R) frente a la proteína P46 de *M. hyopneumoniae* y la proteína empleada como control negativo, BSA. Como control positivo se usó el AcM 1B9H1 conjugado a peroxidasa. Como controles negativos se incubaron pocillos en ausencia de aptámeros (Anti-DIGO) y con el aptámero AGA.

A la vista de los resultados, se puede deducir que en presencia de la proteína P46 se obtiene una señal basal al incubar con cualquier molécula de aptámero, como se evidencia de la incubación con el aptámero AGA, que no se obtiene frente a la proteína empleada como control negativo. Considerando esa señal basal como punto de corte, se decidió que los aptámeros que mostraban un mejor comportamiento en ELONA eran los aptámeros 9F, 17R y 17F, por lo que se sintetizaron de forma química y se caracterizaron para ser empleados en el desarrollo de métodos diagnósticos.

Los resultados de la caracterización se muestran en la siguiente tabla.

**TABLA IV.6** | Características de los aptámeros seleccionados frente a la proteína MPB83 de *M. hyopneumoniae* (media  $\pm$  SD)

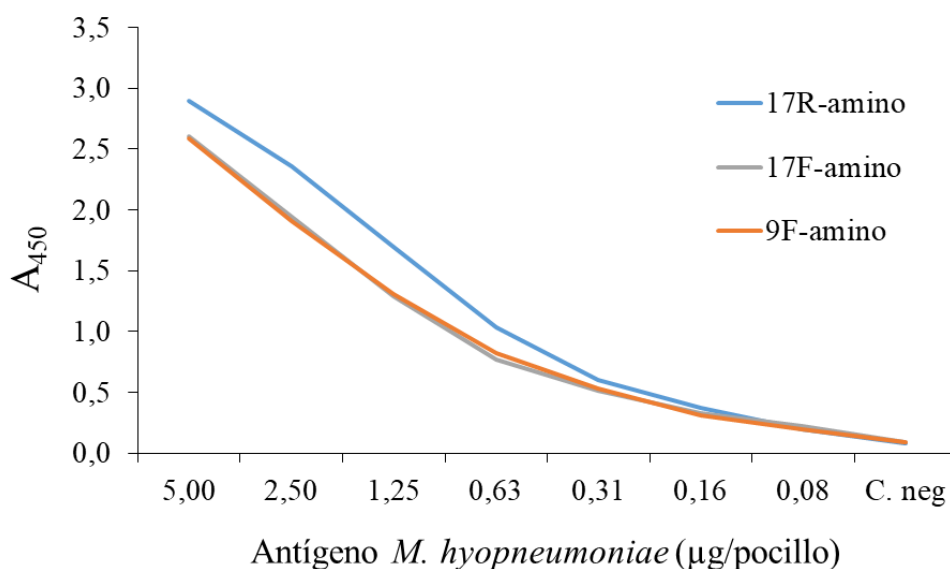
| Nombre | Estructura  | Kd (nM)       | Bmax          |
|--------|---|---------------|---------------|
| Ap 9F  |  | $3,4 \pm 1,0$ | $0,2 \pm 0,0$ |
| Ap 17R |  | $1,8 \pm 1,2$ | $0,8 \pm 0,1$ |
| Ap 17F |  | $3,3 \pm 0,9$ | $1,2 \pm 0,1$ |

La predicción estructural *in silico* de los aptámeros 9F, 17R y 17F seleccionados frente a la proteína P46 de *M. hyopneumoniae* se muestra dentro de la Tabla IV.6. Los recuadros negros marcan los residuos involucrados en la formación de planos G-cuádruples distinguiéndose dos estructuras G-cuádruples formadas por 3 planos (- -) y 2 planos (-) respectivamente. Los tres aptámeros seleccionados presentan buenos parámetros de afinidad por la proteína P46, siendo el aptámero 17R el que menor valor de Kd presenta (1,8 nM) y, por tanto, el que daría lugar a un ensayo diagnóstico con menor límite de detección teórico. Así mismo, a igual cantidad de proteína tapizada, el aptámero 17F muestra mayores valores máximos de Absorbancia a 405 nm. El aptámero 9F aparece como el peor candidato desde el punto de vista teórico para el desarrollo de ensayos diagnósticos por tener un mayor valor de Kd con un valor de Bmax poco elevado [Tabla IV.6]. Las figuras de la predicción estructural de los aptámeros muestran que tanto el aptámero 9F como el 17R presentan un elevado número de enlaces entre pares de bases teóricos, aunque no presentan capacidad de formación de planos G-cuádruple. Por otro lado, el aptámero 17F muestra pocas uniones teóricas entre pares de bases, pero de acuerdo con la predicción estructural, podría formar en su estructura terciaria dos planos G-cuádruples, uno con tres niveles (marcado en la Tabla IV.6 en líneas discontinuas) y otro de dos niveles (marcado en líneas continuas), lo que lo convierte en una molécula más estable.

#### IV. 2. 2. 4 Desarrollo de ensayos ELASA

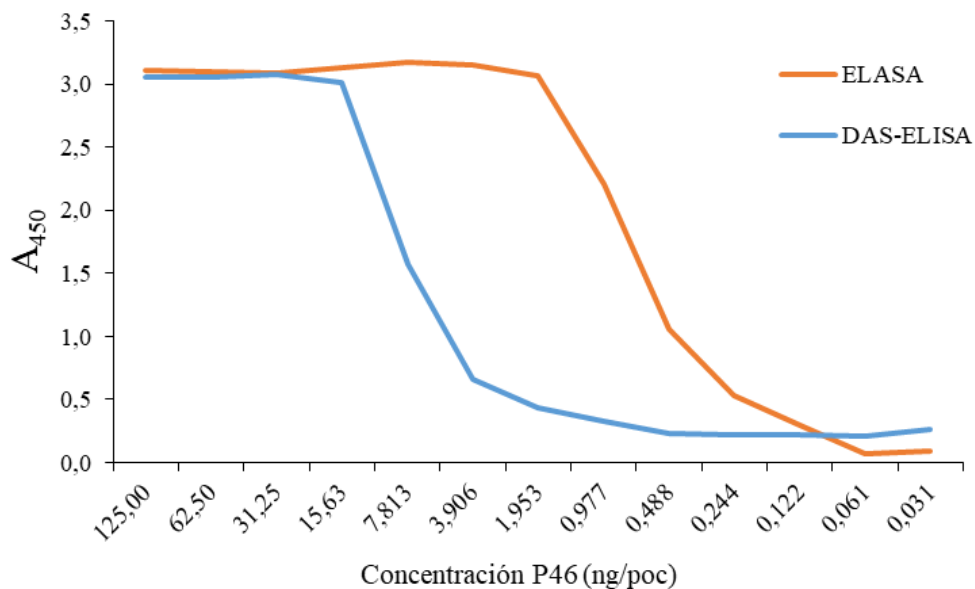
Aunque los resultados de caracterización *in vitro* mostraban que el mejor aptámero era el 17F, se decidió probar los tres aptámeros seleccionados en el desarrollo de ensayos ELASA. Para la selección de condiciones se empleó una preparación de antígeno nativo inactivado obtenido a partir de de cultivo celular. Los aptámeros marcados con un grupo biotina mostraron unos parámetros de especificidad bajos, dando elevadas señales de  $A_{450}$  con proteínas no relacionadas, de modo que se descartaron para el desarrollo de ensayos diagnósticos, empleando los aptámeros modificados con un grupo amino.

Los aptámeros seleccionados frente a la proteína P46 mostraron el mismo comportamiento independientemente del tampón de dilución de ADN empleado para el recubrimiento, de modo que en la Figura IV.30 se muestran únicamente los valores obtenidos con el tampón sciSPOT Oligo B2. Los aptámeros 9F y 17F exhiben un comportamiento muy similar y, en este caso, es el aptámero 17R el que parece exhibir unos valores de  $A_{450}$  mayores al aumentar la cantidad de antígeno. A pesar de esta observación, todos los aptámeros ensayados exhiben el mismo límite de detección con el antígeno nativo llegando a un valor de 1,6  $\mu\text{g/ml}$ , lo que puede considerarse un buen parámetro ya que el antígeno empleado era un antígeno nativo no purificado.



**FIGURA IV.30 | Evaluación de aptámeros específicos frente a la P46 en ELASA.** Titulación de antígeno inactivado de *M. hyopneumoniae* mediante ELASA, empleando para el recubrimiento de placas los distintos aptámeros disponibles modificados con un grupo amino. El eje Y muestra los valores de Absorbancia a 450 nm para cada punto de la titulación. El eje X la concentración de antígeno añadida al pocillo. Como control negativo, los pocillos se incubaron en ausencia de proteína.

Nuevamente, los anticuerpos monoclonales específicos frente a la P46: 3GH7 y 1B9H1 se evaluaron como agentes detectores en combinación con el aptámero 17R. El anticuerpo 3GH7 mostró un mayor valor de Absorbancia en presencia de muestras negativas al mismo tiempo que una señal menor en presencia de muestras positivas que el 1B9H1, de modo que se seleccionó el anticuerpo 1B9H1 conjugado a peroxidasa como revelador (resultado no mostrado). Al determinar el límite de detección del ensayo con la proteína recombinante expresada en el sistema de *E. coli* se estableció un límite de detección de la proteína P46 de 1,2 ng/ml (0,122 ng/pocillo), un parámetro muy superior al obtenido con el ensayo DAS-ELISA (20 ng/ml; 1,953 ng/pocillo) en que se empleaba el anticuerpo 1B9H1 como capturarador y revelador en el ensayo. Los resultados obtenidos con el ELISA y el DAS-ELISA se muestran en la Figura IV.31.

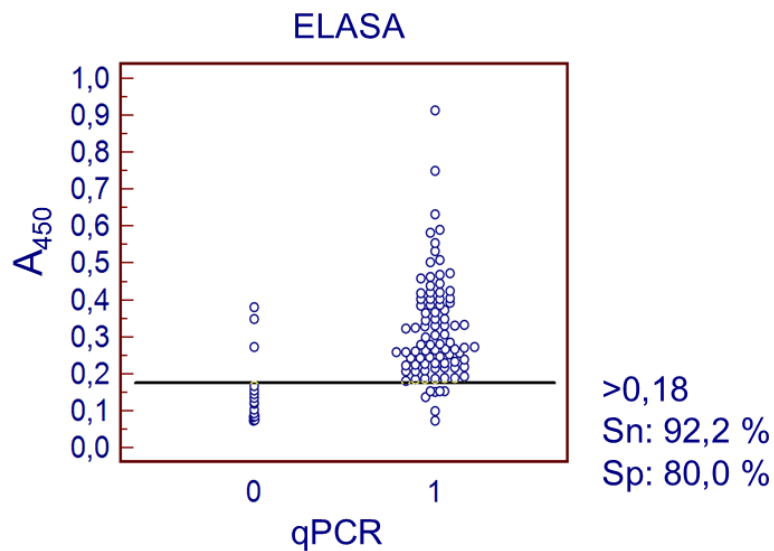


**FIGURA IV.31 | Comparación entre la sensibilidad analítica del DAS-ELISA y el ELISA de *M. hyopneumoniae*.** Curva de titulación de la proteína P46 (*E. coli*) con los dos ensayos optimizados, DAS-ELISA (línea azul) y ELISA (línea naranja). El eje X muestra la concentración de proteína recombinante añadida (ng/pocillo) y el eje Y muestra los valores de A<sub>450</sub>.

En las primeras pruebas empleando distintos tampones de dilución de muestra no se consiguió detectar ninguna muestra positiva, de modo que se decidió aplicar el protocolo de tratamiento de muestras descrito en el apartado anterior IV.2.2.2 para el DAS-ELISA. Con este protocolo se procedió a analizar las mismas 105 muestras de hisopos traqueobronquiales y fluidos de lavados broncoalveolares empleadas en la validación del ensayo DAS-ELISA. Los resultados de A<sub>450</sub> obtenidos para cada una de

## Resultados

las muestras se evaluaron mediante ensayo por curva ROC para establecer el mejor punto de corte para el inmunoensayo ELASA optimizado [Figura IV.32].



**FIGURA IV.32 | Análisis mediante curva ROC de los resultados del ELASA de *M. hyopneumoniae*.** Diagrama de puntos en que se muestran los valores de A<sub>450</sub> obtenidos mediante ELASA (eje Y) para cada una de las muestras analizadas caracterizadas como positiva (1) o negativa (0) mediante qPCR.

Como se observa en la Figura IV.32, el ELASA muestra un parámetro de sensibilidad muy prometedor, con un 92,2 %, detectándose 7 muestras como falsos negativos dentro de las 90 muestras positivas evaluadas. En total, 3 muestras caracterizadas como negativas con el ensayo de referencia qPCR, de las 15 analizadas, se detectaron como falso positivo, dando paso en las condiciones establecidas y con el bajo número de muestras analizado, a una especificidad del 80 %. Sin embargo, un parámetro a tener en cuenta son los valores observados de A<sub>450</sub>, que se encontraron para la mayoría de las muestras ensayadas entre 0,2 y 0,6, comprometiendo la funcionalidad del ensayo.

### IV. 2. 3 **Circovirus porcino tipo 2 (PCV2)**

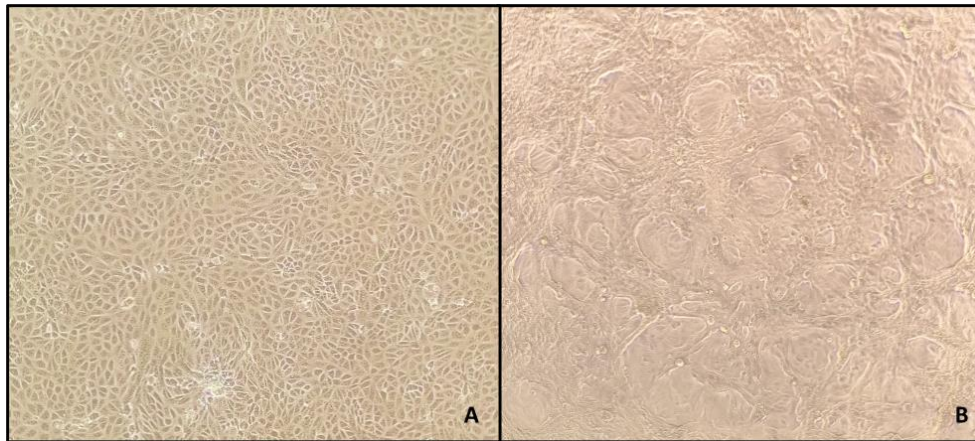
Dentro de los circovirus que afectan al ganado porcino, el único que hasta la fecha se ha asociado con el desarrollo de una patología es el circovirus porcino tipo 2 (PCV2), cuyas mayores diferencias con el resto de circovirus se encuentran en la proteína estructural de la cápsida (Cap). Además de generar por sí mismo una enfermedad sistémica, es uno de los patógenos primarios que aparecen formando parte del complejo respiratorio porcino, como se ha descrito previamente [150, 154].

Los circovirus son virus que se encuentran de forma ubicua en la población porcina desde hace décadas, tienen una distribución geográfica global y una elevada prevalencia debido a que se mantienen fácilmente dentro de las granjas infectadas. El diagnóstico directo de este virus puede llevarse a cabo mediante inmunohistoquímica, hibridación *in situ* o qPCR, con recomendaciones de una u otra técnica específica en función del cuadro observado en el animal. Aunque se han descrito anticuerpos monoclonales que podrían emplearse para el desarrollo de ensayos DAS-ELISA, actualmente no se dispone a nivel comercial, ni se han descrito en bibliografía, este tipo de ensayos [224, 225]. Por lo que desarrollar un ensayo inmunológico que permita identificar al agente patógeno en muestras obtenidas del tracto respiratorio sería de gran utilidad en el control de la patología respiratoria en cerdos. Por esta razón, en el presente trabajo, se decidió abordar el desarrollo de un ensayo ELISA que facilitara el diagnóstico directo de este patógeno.

#### IV. 2. 3. 1 **Proteína de la cápsida PCV2**

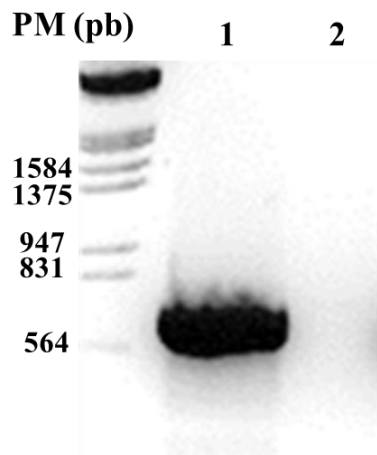
En primer lugar, se procedió a la obtención de la proteína de la cápsida de PCV2 para el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos. Como material de partida se empleó el inóculo de PCV2a USA/MN-081/2007 que se amplificó en cultivo celular sobre monocapa de células VERO para la extracción de su ADN genómico [Figura IV.33]

## Resultados



**FIGURA IV.33 | Cultivo de PCV2 sobre monocapa de células VERO. A.** Células VERO antes de la infección. **B.** Células VERO formando sincitios tras la infección con PCV2 a una MDI inicial baja.

El gen codificante para la proteína de la cápsida (Cap) se amplificó mediante PCR a partir del ADN genómico viral empleando oligonucleótidos específicos. Mediante análisis en electroforesis en gel agarosa, se obtuvo una banda que se correspondía con el tamaño esperado para el gen de 702 pb [Figura IV.34].

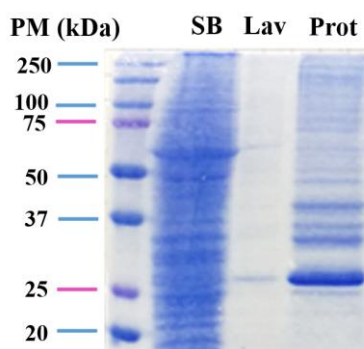


**FIGURA IV.34 | Amplificación del gen codificante de la proteína Cap de PCV2.** Electroforesis en gel de agarosa y tinción con gelRed de **1.** Producto de PCR tras la amplificación del gen codificante de la proteína Cap de PCV2. **2.** Control negativo.

El producto de PCR se ligó en el plásmido de clonaje pCR8/TOPO/GW y se subclonó en los plásmidos pDEST14 (sin péptido de fusión) y pDEST17 (incorporación de 6xHis en el extremo amino-terminal) para la expresión en el sistema de *E. coli*, así como en el plásmido de transferencia pBacPAK8/GW para la expresión en células de insecto a través del sistema de baculovirus.

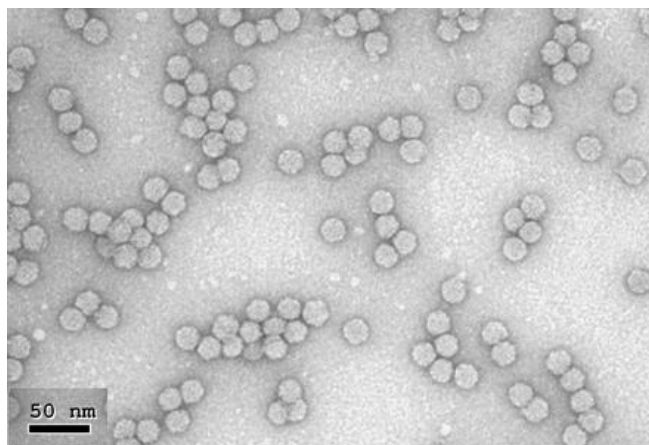
La proteína Cap de PCV2 no se logró expresar en células de *E. coli* con ninguna de las cepas productoras disponibles en el laboratorio, ni variando las condiciones estándar de producción de proteína en este sistema. Sólo se observó una mínima expresión en la construcción del pDEST17+Cap.

Para la expresión de la proteína recombinante en células de insecto se siguió el mismo flujo de trabajo descrito previamente. Las condiciones óptimas para la expresión se establecieron en la infección de cultivos de Sf9 a  $1 \times 10^6$  cel/ml a una MDI de 5 ufp/cel con recogida a las 72 h post-infección. La proteína recombinante se obtuvo en la fracción insoluble de las células, por lo que se aplicó un protocolo de purificación a partir de la fracción celular insoluble descrito en el apartado III.2.7.1 y posterior solubilización mediante sarcosilo. La proteína semipurificada se obtuvo a una concentración de 1,5 mg/ml [Figura IV.35], obteniéndose un rendimiento total de 9 mg por  $1 \times 10^8$  células Sf9.



**FIGURA IV.35 | Purificación de la proteína Cap.** Análisis mediante SDS-PAGE y posterior tinción con azul de Coomassie de las fracciones recogidas durante la purificación a partir de la fracción celular insoluble y solubilización mediante sarcosilo. **SB.** Fracción soluble tras lisis celular. **Lav.** Lavados fracción insoluble. **Prot.** Cap semipurificada.

Para tratar de purificar más la proteína y, dado que en el virus la proteína Cap forma la cápsida de estructura icosaédrica, se aplicó a la fracción insoluble el protocolo de purificación por ultracentrifugación sobre colchones de sacarosa (III.2.7.3). La capacidad de la proteína producida de formar estructuras cuaternarias se evaluó mediante microscopía electrónica con tinción negativa. En la Figura IV.36 se muestra que la proteína Cap obtenida en células de insecto presenta la capacidad de autoensamblar en estructuras homogéneas similares al virus (VLPs) cuyo tamaño se encuentra entorno a los 20-25 nm, que es el tamaño descrito en bibliografía para este virus. Estas VLPs han mostrado un alto grado de inmunogenicidad en estudios posteriores.

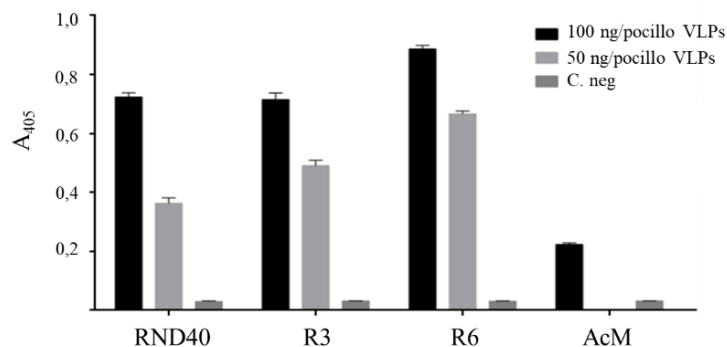


**FIGURA IV.36 | Fotografía de microscopía electrónica de las VLPs de PCV2.** Fotografía tras tinción negativa de la fracción soluble obtenida tras aplicar el protocolo de purificación por ultracentrifugación sobre colchones de sacarosa.

### IV. 2. 3. 2 Selección de aptámeros

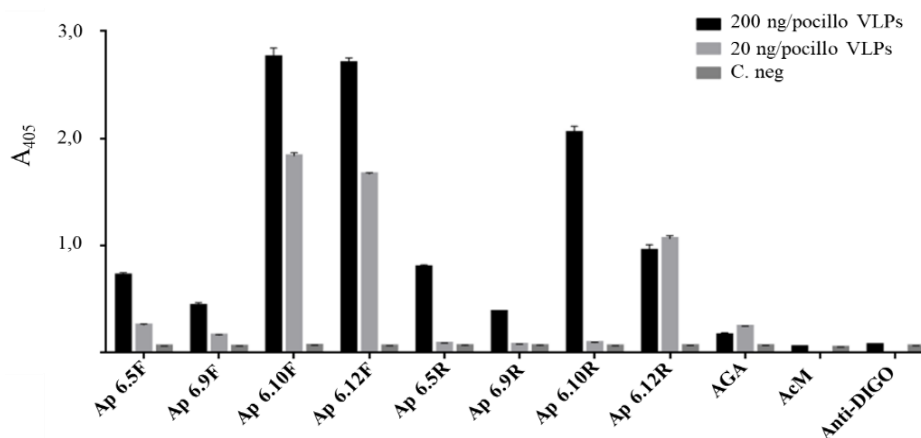
Las VLPs de PCV2 obtenidas de forma recombinante se emplearon como diana para la selección de aptámeros específicos. La proteína se capturó en pocillos de placas de microtitulación a través del anticuerpo monoclonal 36A9 disponible en el laboratorio. En las distintas rondas de selección se emplearon 2 pocillos de dichas placas (100 pmol de proteína recombinante) usando como molde en la contraselección pocillos tapizados únicamente con el anticuerpo monoclonal empleado en la captura de las VLPs.

Debido a que la población de partida RND40 está formada por moléculas sintetizadas de forma aleatoria, la alícuota inicial de cada selección es distinta, por lo que iniciar una nueva selección es una alternativa para obtener aptámeros en los casos en que no se consigan aislar. En el caso de PCV2, fue necesario realizar 3 selecciones distintas, ya que en las dos primeras selecciones no se obtuvieron aptámeros con una selectividad suficiente por la proteína Cap. Durante la tercera selección, fue necesario realizar 6 rondas aplicando la metodología SELEX para obtener una selectividad suficiente de la población de aptámeros por la proteína de interés y dos rondas de contraselección empleando pocillos tapizados únicamente con el anticuerpo monoclonal 36A9 en ausencia de las VLPs recombinantes. Las poblaciones obtenidas tras las rondas 3 y 6 así como la población RND40 inicial se marcaron mediante PCR con un grupo digoxigenina para evaluar su respuesta frente a las VLPs en ELONA. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura IV.37.



**FIGURA IV.37 | Evaluación de poblaciones SELEX de la Cap mediante ELONA.** Señal media ( $\pm$  SD) de  $A_{405}$  obtenida mediante ELONA empleando como detector la población obtenida tras las rondas 3 (R3) y 6 (R6) del proceso SELEX, así como con la población inicial RND40 marcadas con digoxigenina frente a dos concentraciones de VLPs y frente a la proteína negativa (BSA, C. neg). Como control positivo se introdujo el AcM 36A9 conjugado a peroxidasa.


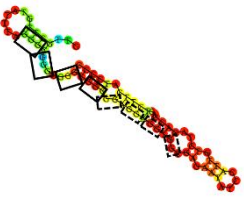

Nuevamente, la población de RND40 mostró una elevada señal de Absorbancia con la proteína diana como se observa en la Figura IV.37. Mientras que con los pocillos recubiertos a 100 ng/pocillo no se observa una gran diferencia de Absorbancia entre las distintas poblaciones, los pocillos recubiertos a 50 ng/pocillo muestran un claro aumento de la señal obtenida a medida que aumentan las rondas de selección. De este modo, la población de aptámeros obtenida tras la ronda 6 se clonó para el aislamiento de clones de aptámeros. Los plásmidos extraídos de las distintas colonias de *E. coli* obtenidas se marcaron y se evaluó su respuesta en ELONA marcando ambas cadenas, seleccionando los mejores candidatos para la obtención de aptámeros: 6.5, 6.9, 6.10 y 6.12. Seguidamente, estos clones se marcaron con digoxigenina de forma diferencial en sus dos cadenas y se evaluó su respuesta mediante ELONA [Figura IV.38].



**FIGURA IV.38 | Evaluación mediante ELONA de clones de aptámeros aislados frente a la proteína Cap.** Señal media de  $A_{405}$  ( $\pm$ SD) obtenida en ELONA empleando aptámeros marcados de forma diferencial en su cadena directa (F) y reversa (R). Como controles negativos se incluyeron el aptámero AGA y pocillos incubados en ausencia de aptámeros (Anti-DIGO).

## Resultados

Como se muestra en la figura anterior, los aptámeros 6.10F y 6.12F muestran un comportamiento muy similar, siendo los que mayores señales mostraron en ELONA. Al secuenciar los clones, se confirmó que las secuencias obtenidas para los clones 6.10 y 6.12 eran idénticas, por lo que se trataba del mismo aptámero. Sin embargo, los aptámeros 6.10R y 6.12R, aunque mostraron una respuesta elevada por las VLPs, no mostraron un comportamiento idéntico. Los aptámeros 6.9R y 6.9F mostraron las señales más bajas en el ELONA por lo que se descartaron, seleccionando como los mejores candidatos para el desarrollo de ensayos a los aptámeros 6.5R, 6.10F y 6.10R que se sintetizaron químicamente conjugados a un grupo digoxigenina para su caracterización mediante predicción estructural y evaluación de parámetros de afinidad [Tabla IV.7].

| TABLA IV.7   Características de los aptámeros seleccionados frente a la proteína Cap de PCV2 (media $\pm$ SD) |   |                   |                          |
|---|---|-------------------|--------------------------|
| Nombre  | Estructura  | Kd (nM)           | Bmax (A <sub>405</sub> ) |
| Ap 6.5R   |   | 0,260 $\pm$ 0,122 | 2,370 $\pm$ 0,168        |
| Ap 6.10R  |  | 0,276 $\pm$ 0,072 | 2,630 $\pm$ 0,104        |
| Ap 6.10F  |  | 0,188 $\pm$ 0,131 | 1,390 $\pm$ 0,147        |

Los aptámeros seleccionados frente a la Cap de PCV2 son los que mayor afinidad por su proteína diana muestran, con valores de Kd que se encuentran en el rango picomolar, y con unos valores de Bmax elevados como se muestra en la Tabla IV.7. El aptámero 6.5R muestra una estructura básica más simple, con un bajo número de uniones entre pares de bases posibles a diferencia de los aptámeros 6.10R y 6.10F. Así mismo, el aptámero 6.10R muestra en su estructura dos posibles planos G-cuádruples, uno formado por tres planos de tetraedros de guanina (recuadros de línea continua) y otro por dos

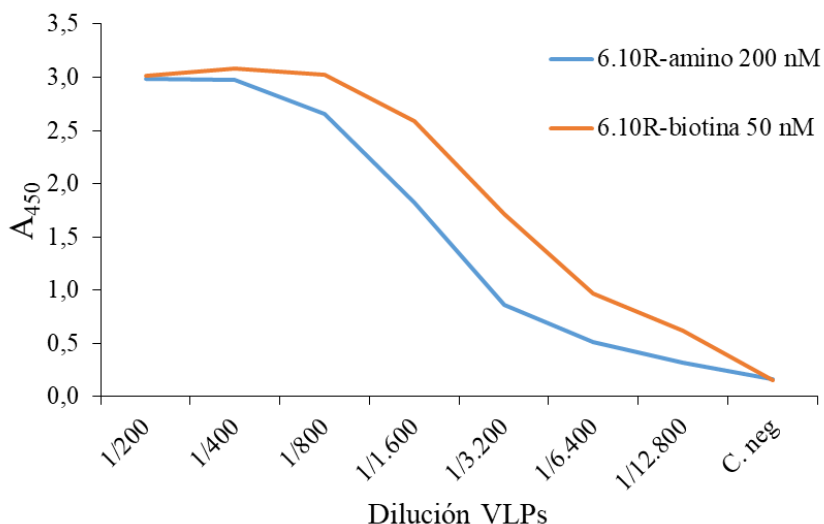
(recuadros de línea discontinua), lo que confiere al aptámero una mayor estabilidad y resistencia a la degradación.

#### **IV. 2. 3. 3 Desarrollo de ensayos ELASA**

Siguiendo el mismo flujo de trabajo descrito previamente, los tres aptámeros seleccionados frente a la Cap se evaluaron para el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos. El aptámero 6.10F exhibió unos parámetros peores que los otros dos aptámeros en las primeras pruebas llevadas a cabo, por lo que se descartó. Así mismo, los aptámeros 6.5R y 6.10R exhibieron una respuesta idéntica. Por este motivo, se seleccionó el aptámero 6.10R para el desarrollo de nuevos ensayos ELASA por mostrar mejores parámetros de estabilidad y durabilidad teóricos al presentar dos planos G-cuádruples en su estructura y una mayor proporción de formación de pares de bases.

En primer lugar, se determinaron las mejores condiciones para el recubrimiento de los pocillos de placas de microtitulación empleando las distintas estrategias de modificación de aptámeros descritas. Para ello, los aptámeros se sintetizaron químicamente conjugados a un grupo amino a través de un conector de 6 carbonos o a biotina y, con ellos, se recubrieron los pocillos de placas de microtitulación a distintas concentraciones de aptámero capturador en el recubrimiento. Con estas placas, se procedió a realizar una titulación de las VLPs recombinantes y el ensayo se reveló a través de la adición del AcM 36A9 conjugado a peroxidasa. En la siguiente figura se muestran los resultados de  $A_{450}$  obtenidos mediante la evaluación de los ELASA en las mejores condiciones de recubrimiento de cada una de las aproximaciones empleadas: 50 nM para el aptámero marcado con un grupo biotina sobre placas de estreptavidina y 200 nM para el aptámero marcado con un grupo amino sobre placas de poliestireno de alta capacidad de unión.

Como se observa en la Figura IV.39, la estrategia que mejores resultados mostró fue el recubrimiento de placas de estreptavidina con aptámeros modificados con un grupo biotina, ya que a una concentración de recubrimiento de aptámeros muy inferior (50 nM), se obtuvieron unos valores de Absorbancia mayores y, con ello, un mayor límite de detección que con el aptámero marcado con un grupo amino. Para obtener unos resultados similares con el aptámero-amino, fue necesario aumentar la concentración de recubrimiento hasta los 200 nM. Ambas aproximaciones mostraron un valor de Absorbancia bajo con la proteína empleada como control negativo en el ensayo.



**FIGURA IV.39 | Evaluación de aptámeros específicos frente a la Cap de PCV2 en ELISA.** Curva de titulación de las VLPs de PCV2 empleando distintas estrategias de recubrimiento de las placas con el aptámero 6.10R en combinación con el AcM 36A9 conjugado a peroxidasa.

En estas condiciones se procedió a optimizar el protocolo de extracción de las muestras, dado que, al igual que sucedía con *M. hyopneumoniae*, PCV2 es un virus intracelular. En este caso, además de la ruptura mecánica, se probaron distintos tampones para la ruptura celular a fin de maximizar la cantidad de virus en la muestra. El resultado más prometedor, como se muestra en la Tabla IV.8, se obtuvo con el tampón de lisis descrito por Dhabaria *et al.* [226] para la extracción de proteínas en técnicas de análisis proteómico. Las muestras se incubaron 15 min en el tampón descrito: 100 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 2 % (p/v) octil-β-glucopiranosido, 2 % (p/v) plurónico-68, pH 7,4; y seguidamente, las muestras se diluyeron 1:1 en solución de bloqueo y estabilización (SBE), añadiendo 100 μl sobre cada pocillo de las placas del ELISA.

**TABLA IV.8 | Tratamiento de muestras para maximizar la detección de PCV2**

| Tampón/Tratamiento de lisis                  | Muestra negativa | Muestra positiva |
|--|------------------|------------------|
| Ruptura mecánica (circonio)                  | +/-              | ++               |
| PBS + Tritón X-100                           | +/-              | ++               |
| PBS + Tween20                                | +/-              | ++               |
| SBE + Detergentes                            | -                | +                |
| Tampón lisis <sup>[226]</sup>                | -                | +                |
| Tampón lisis <sup>[226]</sup> , dilución SBE | -                | +++              |
| Sin tratar, dilución en SBE                  | -                | -                |

Sin embargo, al proceder a analizar mayores cantidades de muestras, se comenzó a tener problemas de elevadas señales de Absorbancia en muestras negativas, seguramente debido a la complejidad del tampón de lisis. No se observó correlación alguna entre el valor de  $A_{450}$  obtenido para las muestras y su clasificación en positivas o negativas con la técnica de referencia (qPCR), por lo que el prototipo de descartó (resultado no mostrado).

#### **IV. 2. 4 Virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV)**

Como se ha comentado en la introducción, actualmente los dos genotipos originarios de PRRSV: PRRSV-1 y PRRSV-2, se han reclasificado a nivel taxonómico como dos especies independientes. Dentro del genoma de estos virus, la región codificante de la proteína de la nucleocápsida (N) es una de las zonas más conservadas con un porcentaje de identidad de aminoácidos del 96-100 % dentro de aislados PRRSV-2 y del 94-96 % dentro de aislados PRRSV-1. Sin embargo, al comparar estas identidades entre aislados de PRRSV-1 y PRRSV-2, el porcentaje cae a un 59-63 % [159].

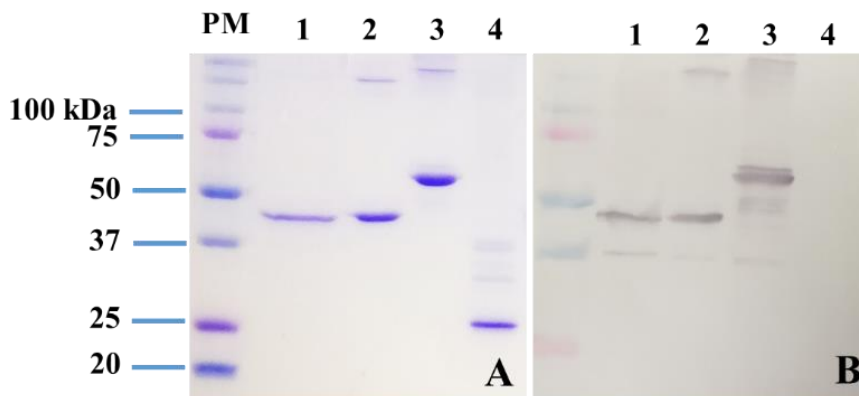
Aunque inicialmente PRRSV-1 estaba limitado a Europa y PRRSV-2 a América, actualmente ambas especies se encuentran distribuidas por todo el mundo, apareciendo en todos los países en que se lleva a cabo una producción intensiva de cerdos. Para el diagnóstico directo se dispone de herramientas como la inmunohistoquímica, la hibridación *in situ* en tejidos fijados y RT-PCR, pero no se dispone de ensayos tipo ELISA [198]. En 2011, Li, Xue-Song *et al.* [227] describieron por primera vez un test de inmunocromatografía para la detección del antígeno de PRRSV en muestras de campo con una sensibilidad y una especificidad superiores al 90 % que se encuentra disponible en el mercado chino pero no ha tenido una buena implantación.

##### **IV. 2. 4. 1 Proteína N de PRRSV**

Cuando se inició este trabajo de tesis doctoral, ya se disponía en el laboratorio de los plásmidos de expresión de las proteínas de interés de PRRSV en células de *E. coli*. En concreto se disponía de los plásmidos pET3xa con las secuencias de los genes codificante de tres variantes de la proteína de la nucleocápsida (N) del PRRSV clonadas: la N de PRRSV-1, la N de PRRSV-2 y una proteína quimera que combinaba las proteínas N de ambas especies. Todas ellas se produjeron en *E. coli* fusionadas al péptido de fusión P10 [Anexo II]. La proteína N de PRRSV-1 se purificó a partir de la fracción celular insoluble

## Resultados

aplicando un protocolo de solubilización mediante Urea (III.2.7.1.3). La proteína N de PRRSV-2 se purificó aplicando a la fracción insoluble un protocolo de solubilización empleando cloruro de guanidinio (III.2.7.1.2). Y, por último, la proteína N quimera se obtuvo en la fracción insoluble tras aplicar el protocolo de purificación de la fracción celular insoluble (III.2.7.1) con un elevado grado de pureza y una buena respuesta biológica en ELISA. En la siguiente figura se muestra la evaluación mediante SDS-PAGE y posterior tinción con azul de Coomassie y *western blot* de las proteínas obtenidas y empleadas en el presente trabajo.

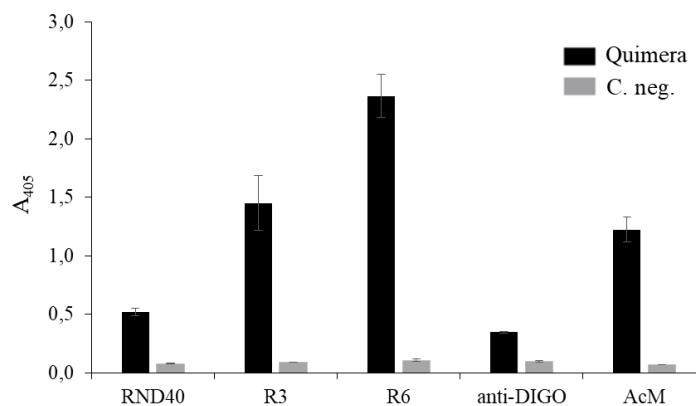


**FIGURA IV.40 | Análisis mediante SDS-PAGE de las proteínas N de PRRSV, y posterior evaluación por A. tinción con azul de Coomassie y B. *Western blot* empleando el AcM 1AC7 específico de la proteína N de PRRSV, frente a un epítipo mantenido entre especies. 1. Proteína N de PRRSV-1, 2. Proteína N de PRRSV-2, 3. Proteína N quimera y 4. Control negativo.**

### IV. 2. 4. 2 Selección de aptámeros

Para la selección de aptámeros se empleó como diana la proteína N quimera de PRRSV, que se capturó en pocillos de placas de microtitulación previamente tapizadas con el anticuerpo monoclonal 1AC7. Las distintas poblaciones de aptámeros se incubaron frente a 100 pmol de la proteína de interés.

En total, fue necesario realizar 6 rondas de selección con las correspondientes contraselecciones empleando pocillos tapizados únicamente con el AcM 1AC7 en ausencia de la proteína de interés. Las poblaciones obtenidas tras la ronda 3 y 6, así como una alícuota de la población inicial RND40, se marcaron mediante PCR con digoxigenina y se evaluó su respuesta en ensayo ELONA para determinar la especificidad de los aptámeros obtenidos por la proteína de interés. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente figura.

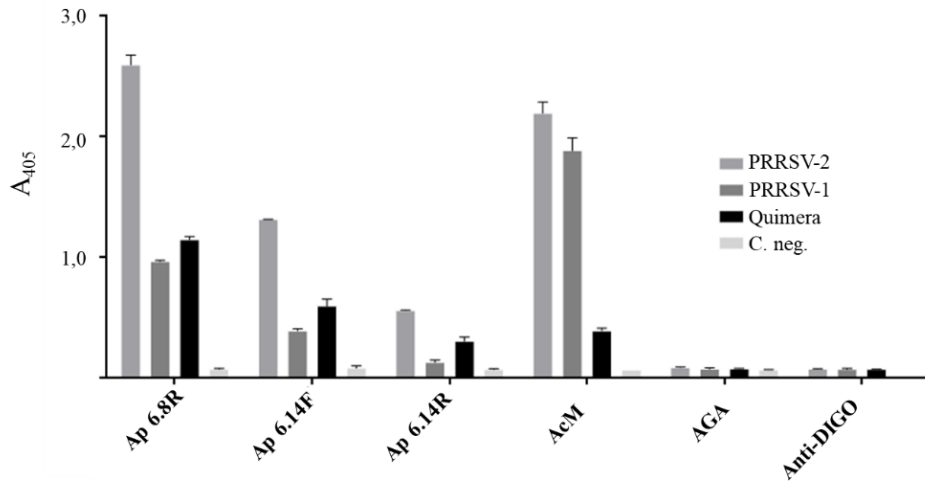


**FIGURA IV.41 | Evaluación mediante ELONA de rondas SELEX frente a la proteína N de PRRSV.** Señal media de  $A_{405}$  ( $\pm$ SD) por ELONA de las rondas 3 (R3), 6 (R6) y población inicial RND40 obtenidas durante el proceso de selección de aptámeros frente a la proteína N quimera, marcadas con digoxigenina y evaluadas frente a la proteína N quimera y a BSA introducida como control negativo. En el ensayo se incluyeron el AcM 1AC7 como control positivo y pocillos incubados en ausencia de aptámeros como control negativo (anti-DIGO).

Como puede observarse en la Figura IV.41, la población obtenida tras la sexta ronda de selección mostró una señal 20 veces superior con la proteína de interés que con el control negativo (BSA) y 4 veces superior a la obtenida con la población RND40. De este modo, la población de ronda 6 se clonó para aislar las moléculas de aptámeros contenidas en ella. Los distintos clones obtenidos se evaluaron mediante ELONA de clones marcando ambas cadenas y, seguidamente, marcando de forma diferencial la cadena directa (F) y la reversa (R), analizándose en paralelo frente a las tres proteínas empleadas en el estudio: N de PRRSV-1, N de PRRSV-2 y N quimera, los mejores candidatos fueron los aptámeros: 6.8R, 6.14F y 6.14R.

Como se observa en la Figura IV.42, los tres aptámeros muestran una señal superior con las proteínas N de PRRSV que con la proteína empleada como control negativo (BSA), que se mantiene a los niveles observados para los controles negativos del ensayo. Todos los aptámeros muestran una señal superior por la variante N de PRRSV-2 que por la quimera y la de PRRSV-1, siendo esta última la que menores señales exhibe.

**Resultados**



**FIGURA IV.42 | Evaluación de clones aislados de aptámeros frente a PRRSV mediante ELONA.** Señales medias ( $\pm$ SD) de  $A_{405}$  obtenidas mediante ELONA frente a las distintas proteínas recombinantes de la nucleocápsida (PRRSV-1, PRRSV-2 y quimera) así como frente a una proteína empleada como control negativo (BSA). Como controles negativos del ensayo se introdujeron el aptámero AGA y pocillos incubados en ausencia de aptámeros. Como control positivo, el AcM 1AC7.

Ante estos resultados, los tres aptámeros se obtuvieron de forma sintética y se caracterizaron para su uso en el desarrollo de ensayos.

| <b>TABLA IV.9   Características de los aptámeros seleccionados frente a la N quimera de PRRSV (media <math>\pm</math>SD)</b> |                   |                   |                                    |
|--|-------------------|-------------------|------------------------------------|
| <b>Nombre</b>  | <b>Estructura</b> | <b>Kd (nM)</b>    | <b>Bmax (<math>A_{405}</math>)</b> |
| <b>Ap 6.8R</b>   |                   | $2,574 \pm 0,635$ | $1,446 \pm 0,0643$                 |
| <b>Ap 6.14F</b>  |                   | $3,736 \pm 1,797$ | $1,176 \pm 0,109$                  |
| <b>Ap 6.14R</b>  |                   | $24,91 \pm 11,72$ | $0,913 \pm 0,1027$                 |

Tanto el aptámero 6.8R como el aptámero 6.14F muestran parámetros de afinidad buenos, con valores de Kd del orden nanomolar, como se muestra en la Tabla IV.9. Sin embargo, el aptámero 6.14R muestra una Kd de 25 nM, mucho más alta que todas las obtenidas hasta la fecha, con el menor valor de Bmax de los tres aptámeros obtenidos. Así mismo, como se muestra en la Tabla IV.9, tanto el aptámero 6.8R como el 6.14F muestran una gran estabilidad según la predicción estructural, mostrando la capacidad de formar un elevado número de puentes entre pares de bases y dos planos G-cuádruples cada uno, uno con tres planos de tétradas de guanina implicados en la formación de la estructura, y otro con dos.

La especificidad de los aptámeros por cada uno de los genotipos de PRRSV se evaluó empleando las proteínas N de PRRSV-1 y PRRSV-2 por separado, a fin de determinar si los aptámeros presentaban mayor capacidad de reconocimiento por uno de los dos genotipos concretos. Los parámetros de afinidad se volvieron a determinar frente a estas proteínas en concreto obteniéndose los datos recogidos en la Tabla IV.10.

**TABLA IV.10** | Especificidad de los aptámeros seleccionados empleando la proteína N quimera de PRRSV frente a las proteínas N de ambas especies

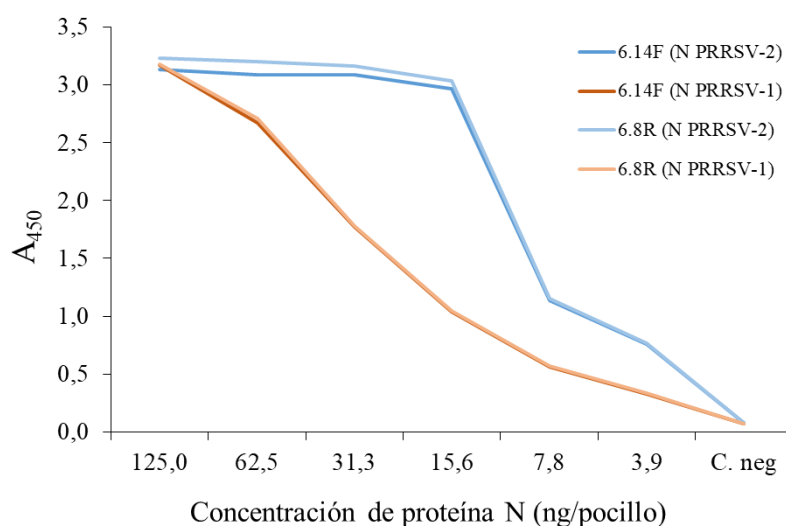
| Nombre          | N PRRSV-1     |                          | N PRRSV-2     |                          |
|-----------------|---------------|--------------------------|---------------|--------------------------|
|                 | Kd (nM)       | Bmax (A <sub>405</sub> ) | Kd (nM)       | Bmax (A <sub>405</sub> ) |
| <b>Ap 6.8R</b>  | 28,68 ± 6,955 | 2,810 ± 0,1683           | 4,691 ± 0,810 | 2,660 ± 0,0895           |
| <b>Ap 6.14F</b> | 95,71 ± 23,70 | 1,867 ± 0,1412           | 20,92 ± 7,41  | 2,192 ± 0,178            |
| <b>Ap 6.14R</b> | 106,5 ± 57,99 | 0,2431 ± 0,0413          | 40,70 ± 16,98 | 0,983 ± 0,1092           |

Como se muestra en la Tabla IV.10, los tres aptámeros seleccionados frente a la proteína N quimera, mostraron unos mejores parámetros de afinidad por la proteína N de PRRSV-2 que por la de PRRSV-1, mostrando en los tres casos una Kd inferior y una Bmax superior por la proteína N de PRRSV-2 según la determinación por ELONA.

### IV. 2. 4. 3 Desarrollo de ensayos ELASA

Los aptámeros 6.8R y 6.14F mostraron mejores parámetros en términos de afinidad y señal máxima que el aptámero 6.14R, exhibiendo unos menores valores de  $K_d$  (mayor afinidad) y mayores valores de  $B_{max}$  (máxima señal de  $A_{405}$ ) por la proteína empleada como molde en la selección [Tabla IV.9], por lo que se seleccionaron para la puesta a punto de los ensayos diagnósticos. Siguiendo el mismo flujo de trabajo descrito para los casos anteriores, se determinó que las mejores condiciones para el ensayo tipo ELASA se conseguían utilizando el aptámero modificado con un grupo biotina sobre placas de estreptavidina, en combinación con el anticuerpo monoclonal 1AC7 conjugado a peroxidasa como molécula detectora. En estas condiciones, se determinó la sensibilidad analítica del ensayo, empleando las proteínas de la nucleocápsida (N) recombinantes de PRRSV de las distintas especies: PRRSV-1 y PRRSV-2.

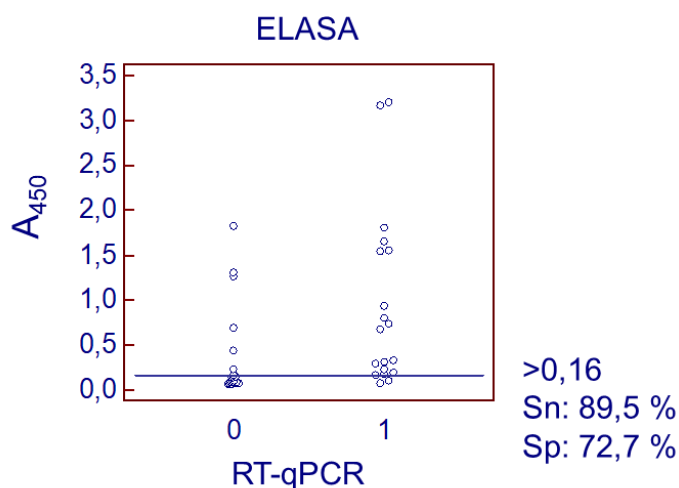
Como se observa en la Figura IV.43, las curvas de titulación tanto del aptámero 6.8R como del 6.14F exhiben unos valores idénticos al recubrir las placas a una concentración saturante, mostrando una sensibilidad mayor por la proteína de PRRSV-2 que por la de PRRSV-1. Para la segunda, el límite de detección se estableció en 39 ng/ml (3,9 ng/pocillo), siendo de, al menos, un punto más de dilución para la proteína N de PRRSV-2 (aproximadamente 20 ng/ml). Estos datos mejoraron significativamente los parámetros obtenidos con las distintas aproximaciones al DAS-ELISA desarrolladas previamente.



**FIGURA IV.43 | Titulación de proteína N de PRRSV-1 y PRRSV-2 mediante ELASA.** En el eje Y se muestran las señales de  $A_{450}$  obtenidas para distintas concentraciones (eje X) de N recombinante (PRRSV-1 y PRRSV-2) obtenidas empleando los aptámeros 6.14F o 6.8R como molécula capturadora del ensayo en combinación con el AcM 1AC7 conjugado a peroxidasa.

En primer lugar, se procedió al análisis de una pequeña cantidad de muestras recubriendo las placas de estreptavidina a concentraciones saturantes de aptámero (500  $\mu\text{M}$ ) para evaluar su capacidad de reconocer antígeno nativo. En dichas condiciones, se analizaron un total de 41 muestras de suero previamente caracterizadas como positivas ( $n = 19$ ) o negativas ( $n = 22$ ) por RT-qPCR. Las muestras se analizaron en paralelo empleando ambos aptámeros y, debido a que se obtuvieron unos parámetros idénticos, solo se muestran los resultados obtenidos con el aptámero 6.14F en las figuras.

Aplicando un análisis de curva ROC a los datos obtenidos [Figura IV.44], los datos óptimos de sensibilidad y especificidad se obtuvieron al aplicar un punto de corte de 0,16 de Absorbancia a 450 nm. Con este punto de corte, los parámetros diagnósticos obtenidos para el ELASA fueron del 89,5 % de sensibilidad (2 muestras dieron un resultado falso negativo) y 72,7 % de especificidad (6 muestras dieron un resultado falso positivo).



**FIGURA IV.44 | Análisis mediante curva ROC de los resultados del ELASA de PRRSV.** Punto de corte óptimo establecido mediante curva ROC y parámetros diagnósticos en base a los resultados de  $A_{450}$  obtenidos mediante ELASA empleando como aptámero capturador el 6.14F para las distintas muestras caracterizadas previamente en positivas (1) o negativas (0) mediante RT-qPCR.

Dado que los aptámeros empleados como agentes capturadores fueron capaces de reconocer de forma específica al virus en muestras de suero, se procedió a la optimización del ensayo a fin de poner a punto un método diagnóstico con una especificidad suficiente para su aplicación en campo. Se trabajó en paralelo con ambos aptámeros por haber mostrado un comportamiento idéntico que imposibilitó descartar a ninguno de ellos.

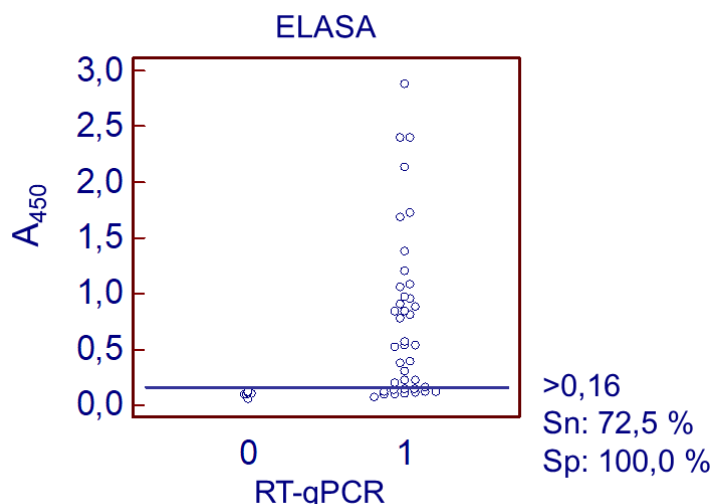
En primer lugar, se realizaron los experimentos necesarios para obtener los parámetros óptimos del ensayo, que se fijaron en las siguientes condiciones:

## *Resultados*

recubrimiento de placas de estreptavidina a 125 nM del aptámero conjugado a biotina, dilución 1/5.000 del AcM 1AC7-PO capaz de reconocer ambas especies de PRRSV y dilución de las muestras  $\frac{1}{2}$  en tampón de ensayo. A continuación, se procedió a analizar un grupo más heterogéneo de muestras de campo caracterizadas empleando la RT-qPCR como técnica de referencia y formado por: 9 muestras positivas de lavados broncoalveolares (BALF), 10 muestras de sangre (7 positivas y 3 negativas), 2 fluidos orales positivos y 37 hisopos bronquiales (31 positivos y 6 negativos).

Los valores de Absorbancia obtenidos con los distintos ELASA se sometieron a un análisis mediante curva ROC para determinar el punto de corte más adecuado para el ensayo, que se estableció en 0,16 arrojando unos parámetros diagnósticos de Sn 57,1 % y Sp 100 % empleando cualquiera de los aptámeros 6.8R o 6.14F como capturadores (resultado no mostrado). De este modo, los ensayos desarrollados mostraron buenos parámetros diagnósticos en cuanto a especificidad, pero muestran una sensibilidad muy baja, de menos del 60 %, para la detección de antígeno.

Las muestras que exhibieron unas mayores señales de Absorbancia empleando el ELASA fueron las muestras de BALF, detectándose las 9 muestras incluidas en el ensayo como positivas. No se detectó la presencia del PRRSV en muestras de sangre ni de fluidos orales, todas las muestras de esta naturaleza incluidas en el ensayo dieron un resultado falso negativo comparado con la RT-pPCR. Entre los hisopos bronquiales, un total de 20 de los 31 hisopos caracterizados como positivos por RT-qPCR, fueron también positivos en el ELASA, dando paso a una sensibilidad en este tipo de muestras del 64,5 %. De modo que se decidió repetir el análisis mediante curva ROC considerando únicamente las muestras de BALF o hisopos broncoalveolares para la detección de antígeno de PRRSV [Figura IV.45].



**FIGURA IV.45 | Análisis mediante curva ROC de los resultados del ELASA de PRRSV tras optimización.** Punto de corte óptimo establecido mediante curva ROC y parámetros diagnósticos asociados, en base a los resultados de  $A_{450}$  obtenidos mediante ELASA empleando como molécula captadora el aptámero 6.14F en combinación con el AcM 1AC7-PO.

Como se muestra en la figura, aplicando un punto de corte de 0,16, se consiguió desarrollar un ensayo con una sensibilidad del 72,5 % con 29 muestras positivas (20 hisopos bronquiales + 9 BALFs) de las 40 que quedaron al eliminar las muestras no aptas para el ensayo y una especificidad del 100 %. Cabe destacar que en el ensayo no se incluyeron muestras negativas de BALF y el número de hisopos negativos fue bajo (6), lo que podría alterar el parámetro de especificidad.

Dado que PRRSV es un virus altamente variable incluso dentro de aislados de la misma especie, se evaluó la capacidad del ensayo de detectar distintos aislados de estos virus, para determinar si el problema con la sensibilidad del ensayo se debía a diferencias significativas en la estructura de la proteína. En total, se analizaron 21 aislados distintos obtenidos en la misma región que las muestras evaluadas (20 caracterizados como PRRSV-1 y 1 caracterizado como PRRSV-2), todos ellos fueron reconocidos específicamente por el ELASA sin diferencias significativas en cuanto a señal o límite de detección (resultado no mostrado).



### **IV. 3. Obtención y caracterización de anticuerpos monoclonales específicos frente a la proteína VP30 de ASFV y su potencial uso como herramientas diagnósticas**

La gran complejidad que presenta el virus de la peste porcina africana hace que sea necesario disponer de múltiples herramientas para su detección. En la actualidad existen ensayos comerciales basados en la detección de Acs frente a la proteína VP72, así, Ingenasa, por ejemplo, dispone de un ensayo tipo ELISA de competición basado en la proteína VP72 para la detección de anticuerpos frente al ASFV. En los últimos años, nuevos estudios han demostrado que la proteína VP30 es un buen candidato para el diagnóstico de esta enfermedad y que, en algunos casos, puede mostrar una mayor sensibilidad para la detección de anticuerpos específicos que la proteína habitualmente utilizada hasta la fecha, la VP72 [179]. Por este motivo, en el presente trabajo se decidió obtener anticuerpos monoclonales frente a esta proteína y trabajar en el desarrollo de nuevos ensayos basados en otro antígeno de gran valor diagnóstico.

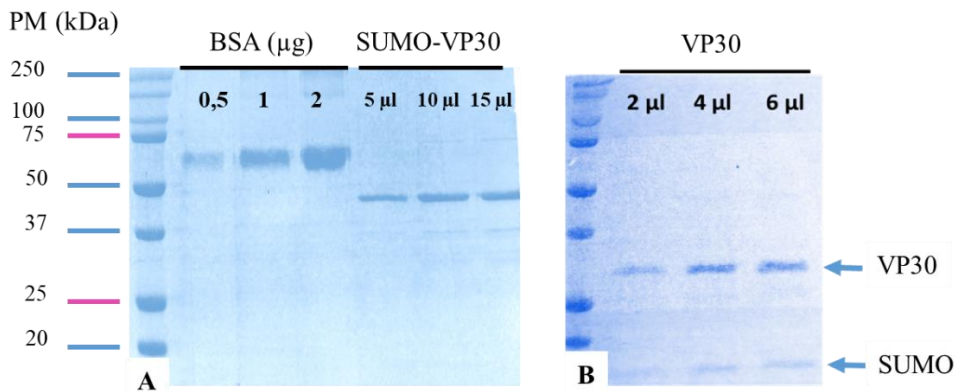
#### **IV. 3. 1 Obtención de VP30 para inmunización de ratones**

Para la inmunización de animales de experimentación, fue necesario obtener un nuevo antígeno VP30 soluble, ya que los antígenos disponibles en el laboratorio por trabajos previos se habían obtenido a partir de la fracción celular insoluble de distintos tipos de células y los compuestos empleados en la solubilización resultan tóxicos para los ratones. Para ello, el gen codificante de la VP30 de ASFV se clonó en el plásmido de expresión pET28A-SUMO, por haber mostrado en trabajos previos un elevado nivel de solubilización de los antígenos recombinantes expresados con el péptido de fusión SUMO. El clonaje se llevó a cabo mediante clonaje clásico a través de enzimas de restricción usando como molde para la amplificación del gen codificante el plásmido pDEST17+VP30 disponible en el laboratorio. El plásmido pET28A-SUMO+VP30 se empleó para transformar células de *E. coli* BL21-AI competentes. Se realizó una cinética de expresión, seleccionándose como condiciones óptimas la recogida del cultivo a 16 h post-inducción, reduciendo la temperatura de incubación durante la producción a 18 °C. La proteína se obtuvo en la fracción soluble de las bacterias y se purificó mediante columnas de afinidad del péptido de fusión 6xHis. La proteína recombinante se obtuvo a una concentración de 0,3 mg/ml con una pureza elevada y del tamaño molecular esperado,

## Resultados

49 kDa, con un rendimiento total de 1 mg de proteína a partir de un cultivo de 100 ml [Figura IV.46A].

Para posteriores aplicaciones, el péptido de fusión de la proteína se digirió mediante incubación con la enzima SUMO proteasa, según protocolo indicado por la casa comercial, y el péptido de fusión se eliminó por columna de afinidad de níquel. De este modo, la proteína de interés se obtuvo en la fracción no retenida de la columna de afinidad. Tras este paso de purificación, la proteína VP30, con un peso molecular de 37 kDa, se obtuvo a una concentración de 0,2 mg/ml aunque la purificación no fue total dado que el péptido de fusión SUMO no se eliminó por completo y aparece como una proteína contaminante [Figura IV.46B]. Con estos datos, el rendimiento final obtenido para esta proteína fue de 0,15 mg de proteína para un cultivo bacteriano de 100 ml.

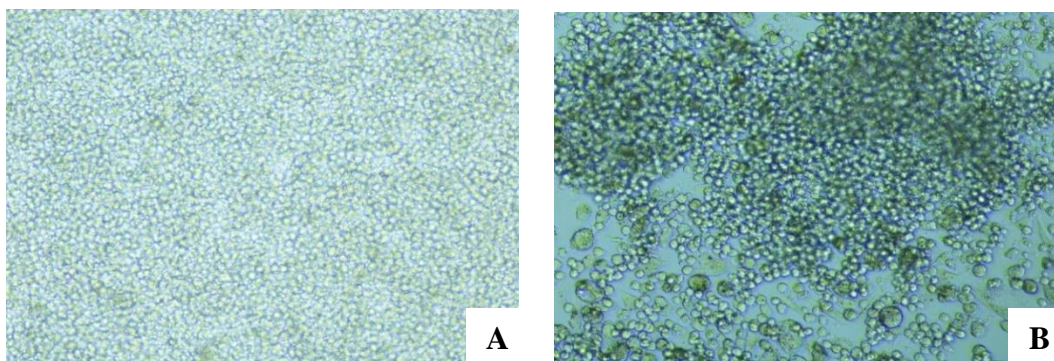


**FIGURA IV.46 | Análisis de la proteína VP30 de ASFV mediante SDS-PAGE, y posterior tinción con azul de Commassie. A.** Proteína SUMO-VP30 purificada y curva de 0,5, 1 y 2 µg BSA. **B.** Proteína VP30 tras la digestión del péptido de fusión SUMO.

### IV. 3. 2 Anticuerpos monoclonales

La nueva proteína recombinante VP30 se empleó para inmunizar ratones BALB/c siguiendo el protocolo descrito en el apartado III.2.8.1. Cuando se obtuvo un título suficiente de anticuerpos, se procedió a extraer el bazo de los animales para la obtención de linfocitos y posterior fusión con células de mieloma (apartado III.2.8.2.). La selección de las células de hibridoma se realizó por su metabolismo diferencial en medio HAT en base al principio descrito en el apartado de materiales y métodos. Las células de mieloma únicamente disponen de la vía de síntesis de bases nitrogenadas mediante la ruta de síntesis *de novo*, por lo cual, en dicho medio de cultivo, tan solo se establecerán líneas celulares producidas por la fusión de una célula de mieloma (inmortalidad) y un linfocito

(ruta de salvamento de nucleótidos). Tanto las células epiteliales y otros tipos celulares, como las no fusionadas o las combinaciones de más de dos células sufren un proceso de muerte celular. Como se muestra en la siguiente figura, la mayoría de las células presentes en la monocapa celular expandida sobre la placa inicialmente [Figura IV.47A], desaparecen por procesos de muerte celular, y solo se aprecia un sobrecrecimiento en determinados puntos de la monocapa de células que, presumiblemente, presentan un metabolismo compatible con el medio HAT [Figura IV.47B].



**FIGURA IV.47 | Fotografías de microscopía óptica del crecimiento de hibridomas.** Observación mediante microscopía óptica del crecimiento durante el proceso de selección de hibridomas en medio HAT. **A.** Cultivo heterogéneo tras la expansión de las células obtenidas tras la fusión. **B.** Sobrecrecimiento de clones de hibridomas.

Tras la selección de hibridomas productores de inmunoglobulinas específicas de la proteína VP30, se obtuvieron tres líneas celulares positivas: 11G9, 13A12 y 13E12. Estos hibridomas se inocularon en biorreactores CELLLine siguiendo el protocolo descrito en el apartado III.2.8.3 y las inmunoglobulinas producidas se purificaron a partir del medio de cultivo por cromatografía de afinidad empleando una resina acoplada a proteína G y proteína A para la obtención de los anticuerpos monoclonales. El hibridoma 13E12 fue el que mostró peor adaptación al crecimiento en biorreactores, observándose un crecimiento más lento que la media y una producción de inmunoglobulina menor, obteniendo una concentración tras la purificación de 0,34 mg/ml. En el caso de las líneas de hibridoma 11G9 y 13A12, se observó un buen crecimiento en biorreactor CELLLine y se consiguió purificar inmunoglobulina a unas concentraciones de alrededor de 1,5 mg/ml en ambos casos. Las inmunoglobulinas obtenidas de los tres hibridomas fueron isotipadas como se describe en el apartado III.2.8.5 clasificándose las tres como IgG1.

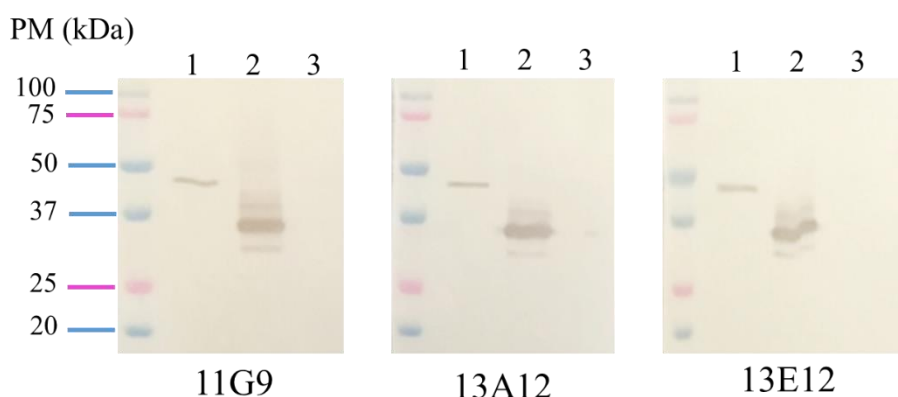
Para la evaluación de los anticuerpos monoclonales obtenidos frente a la proteína VP30 expresada en células de *E. coli*, se empleó una proteína VP30 obtenida en otro

## Resultados

sistema heterólogo de expresión para evitar detectar reactividad asociada a otras moléculas contaminantes del sistema de expresión, la proteína 6xHis-VP30 (BVES). Brevemente, la proteína se obtuvo en células de insecto, empleando el sistema de baculovirus recombinantes. El gen codificante de la VP30 se clonó en el plásmido de transferencia pAcHLTA/GW, a partir del cual, mediante cotransfección con el ADN de baculovirus BacPAK6, se obtuvo el baculovirus recombinante AcHLTA-VP30. A partir del inóculo de alto título que se preparó, se procedió a infectar un cultivo de Sf9 a una densidad de  $1 \times 10^6$  cel/ml estableciéndose las condiciones óptimas de la expresión cuando la infección se llevaba a cabo a una MDI de 2 ufp/cel y la recogida de los cultivos a las 96 h post-infección. La totalidad de la proteína recombinante se obtuvo en la fracción celular insoluble, por lo que se purificó a partir de esta fracción aplicando el protocolo de solubilización con sarcosilo, apartado III.2.7.1.1.

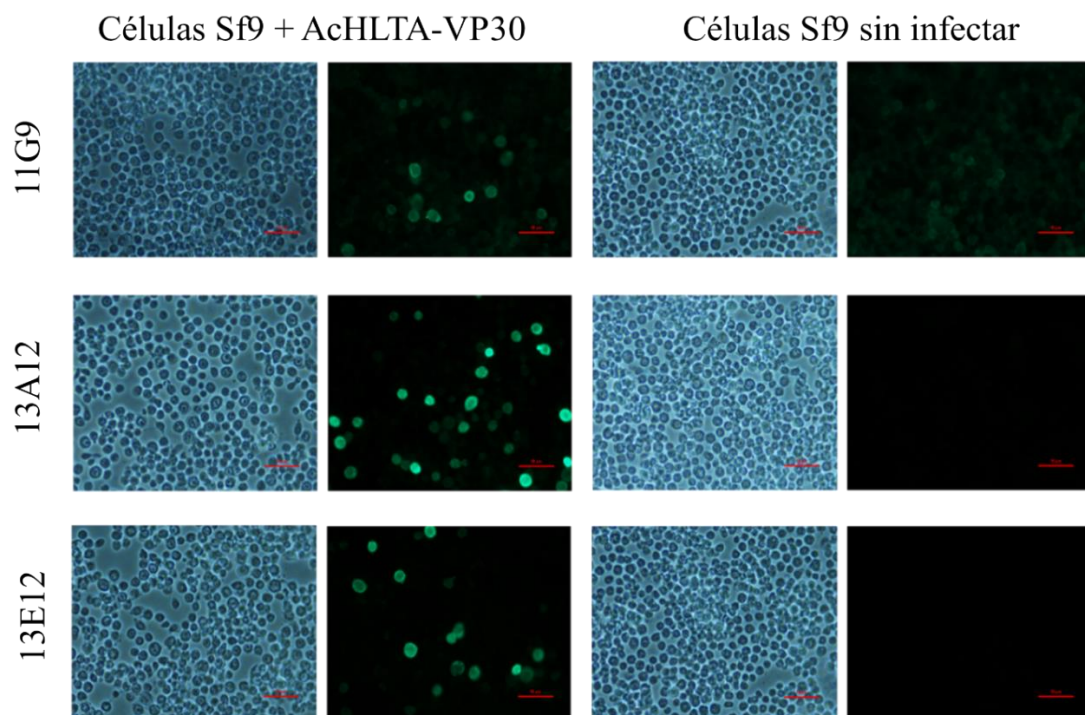
En primer lugar, los anticuerpos monoclonales se marcaron con peroxidasa y, mediante ELISA de competición, se comprobó que los nuevos anticuerpos obtenidos reconocían dos epítomos distintos en la proteína recombinante VP30, mostrando un solapamiento para los anticuerpos 13A12 y 13E12.

Como se observa en la Figura IV.48, los tres anticuerpos monoclonales obtenidos reconocieron de forma específica en *western blot* a las proteínas recombinantes SUMO-VP30 (*E. coli*) y 6xHis-VP30 (BVES), ninguna de ellas empleada en la inmunización. Todos ellos mostraron un reconocimiento específico a unos niveles semejantes, no observándose uniones inespecíficas frente a ninguna de las proteínas incluidas en el control negativo.



**FIGURA IV.48 | Evaluación de AcMs frente a la proteína VP30 en *western blot*.** Inmunodetección en membranas de nitrocelulosa empleando los anticuerpos monoclonales obtenidos frente a la proteína VP30 de ASFV: 11G9, 13A12 y 13E12. **1.** SUMO-VP30 obtenida en células de *E. coli*. **2.** 6xHis-VP30 obtenida en células de insecto (AcHLTA+VP30). **3.** Extracto de células de insecto.

Seguidamente, los anticuerpos monoclonales se caracterizaron mediante inmunofluorescencia, para establecer su capacidad diagnóstica en este formato. El virus de la peste porcina africana (ASFV) es un patógeno catalogado dentro del nivel de bioseguridad 3, lo que implica que para su manejo es necesario trabajar en laboratorios de contención de nivel 3 no disponibles en Ingenasa. Por ello, en la primera evaluación de estos nuevos reactivos los experimentos se llevaron a cabo empleando proteína recombinante en lugar de virus nativo, procediendo a la infección de células Sf9 con el inóculo de baculovirus recombinantes AcHLTA/GW+VP30.



**FIGURA IV.49 | Inmunofluorescencia con los AcMs específicos frente a la VP30.** Fotografías de microscopía óptica y microscopía de fluorescencia de la misma sección de células Sf9 infectadas con el baculovirus recombinante AcHLTA+VP30 o sin infectar. Como anticuerpo primario se emplearon los nuevos AcMs 11G9, 13A12 y 13E12 obtenidos frente a la VP30.

En la Figura IV.49, se puede observar que los tres anticuerpos monoclonales seleccionados muestran un comportamiento altamente específico en inmunofluorescencia, apreciándose claras diferencias entre células infectadas y no infectadas, por lo que podrían utilizarse en el desarrollo de métodos de diagnóstico directo de ASFV mediante inmunofluorescencia o inmunohistoquímica. En las condiciones establecidas, tanto el AcM 13A12 como el 13E12 muestran una señal altamente específica con la VP30, no observándose señal en los cultivos celulares no infectados. Así mismo,

## Resultados

la intensidad de fluorescencia observada con ambos anticuerpos en las células infectadas es muy superior a la obtenida con el AcM 11G9, que muestra, además, cierta señal de fondo en las células Sf9 no infectadas. Por este motivo, en futuras colaboraciones, se evaluará el potencial de los AcMs 13A12 y 13E12 en infecciones con el virus nativo.

Los anticuerpos monoclonales se probaron en distintas combinaciones para evaluar su capacidad de detectar antígeno en formato DAS-ELISA. Mediante ELISA directo, se seleccionó la mejor dilución de uso de los anticuerpos conjugados a peroxidasa, que se empleó en la optimización de ensayos.

Los pocillos de placas de poliestireno de alta capacidad de unión se recubrieron a concentraciones saturantes (1 µg/pocillo) de cada uno de los tres anticuerpos monoclonales. Sobre ellos se tituló el antígeno recombinante obtenido en células de insecto (6xHis-VP30) y se incubó con cada uno de los AcMs conjugados a peroxidasa como reveladores, añadiendo los conjugados a la dilución óptima establecida mediante ELISA directo. Los resultados cualitativos obtenidos en este ensayo se muestran en la Tabla IV.11.

| <b>TABLA IV.11   Combinación de los nuevos AcMs obtenidos frente a la VP30 en DAS-ELISA</b> |                |                 |                 |
|---|----------------|-----------------|-----------------|
|   | <b>1GH9-PO</b> | <b>13A12-PO</b> | <b>13E12-PO</b> |
| <b>1GH9-PO</b>  | +              | +               | +/-             |
| <b>13A12-PO</b>   | +++            | +/-             | +/-             |
| <b>13E12-PO</b>   | +++            | +/-             | -               |

El AcM 13E12 no mostró un buen comportamiento como anticuerpo revelador, dando unas señales muy bajas de Absorbancia a 450 nm en combinación con todos los anticuerpos ensayados. La combinación del anticuerpo 1GH9 como captador con el revelador 13A12-PO exhibió buenos valores de Absorbancia en la titulación; sin embargo, el límite de detección de esta combinación de AcMs fue de 120 ng/ml. Los mejores resultados se obtuvieron al emplear cualquiera de los dos anticuerpos 13A12 o 13E12 como captadores, en combinación con el AcM 1GH9-PO como revelador, alcanzando en ambos casos, un límite de detección de 40 ng/ml. La combinación 1GH9-1GH9-PO mostró buenos valores en la titulación de antígeno recombinante, pero su

sensibilidad fue menor a las otras dos combinaciones seleccionadas como óptimas, observándose un alto de grado de competición por el epítipo [Tabla IV.11].

Los AcMs marcados con peroxidasa se emplearon, además, para tratar de poner a punto un ensayo de detección de anticuerpos específicos frente al ASFV en formato ELISA de competición.

Para ello, se trabajó con la proteína VP30 obtenida en células de insecto, cuyo uso como antígeno para la detección de anticuerpos frente a ASFV, había sido previamente validado en ensayos de ELISA indirecto (INgezim 11.PPA.K1). Esta proteína se empleó para recubrir los pocillos de placas de microtitulación ajustando la concentración de proteína tapizada en 50 ng/pocillo. Los ensayos, con cada uno de los tres anticuerpos monoclonales disponibles, se ajustaron seleccionando el punto óptimo de dilución de las muestras de suero, que se estableció en la dilución ½ en tampón de ensayo, y la mejor concentración de cada AcM conjugado a peroxidasa. En estas condiciones, los ensayos se enfrentaron a distintos sueros de referencia negativos y positivos de ASFV.

**TABLA IV.12 | ELISA de competición para la detección de anticuerpos específicos frente a ASFV: Resultados obtenidos**

| Anticuerpo | Muestra           | A <sub>450</sub> | Competición (%) |
|------------|-------------------|------------------|-----------------|
| 11G9       | Suero ref. ASFV + | 1,8126           | 29,19           |
|            | Suero ref. ASFV - | 2,5598           |                 |
| 13A12      | Suero ref. ASFV + | 1,2264           | 52,15           |
|            | Suero ref. ASFV - | 2,5632           |                 |
| 13E12      | Suero ref. ASFV + | 0,6643           | 48,93           |
|            | Suero ref. ASFV - | 1,3007           |                 |

Como se observa en la Tabla IV.12, ninguno de los 3 anticuerpos ensayados mostró una competición del 100 % con los sueros porcinos de referencia empleados en el ensayo. A pesar de haber trabajado en la optimización de las condiciones, los mejores resultados se obtuvieron con el anticuerpo 13A12 con el que se alcanzó un grado de competición del 52,15 %. El anticuerpo 11G9 mostró, en las mejores condiciones, un porcentaje de competición de tan solo el 29,19 % mientras que el anticuerpo 13E12 mostró los valores de Absorbancia más bajos con el suero de referencia positivo, pero el porcentaje de competición no llegó al 50 %.



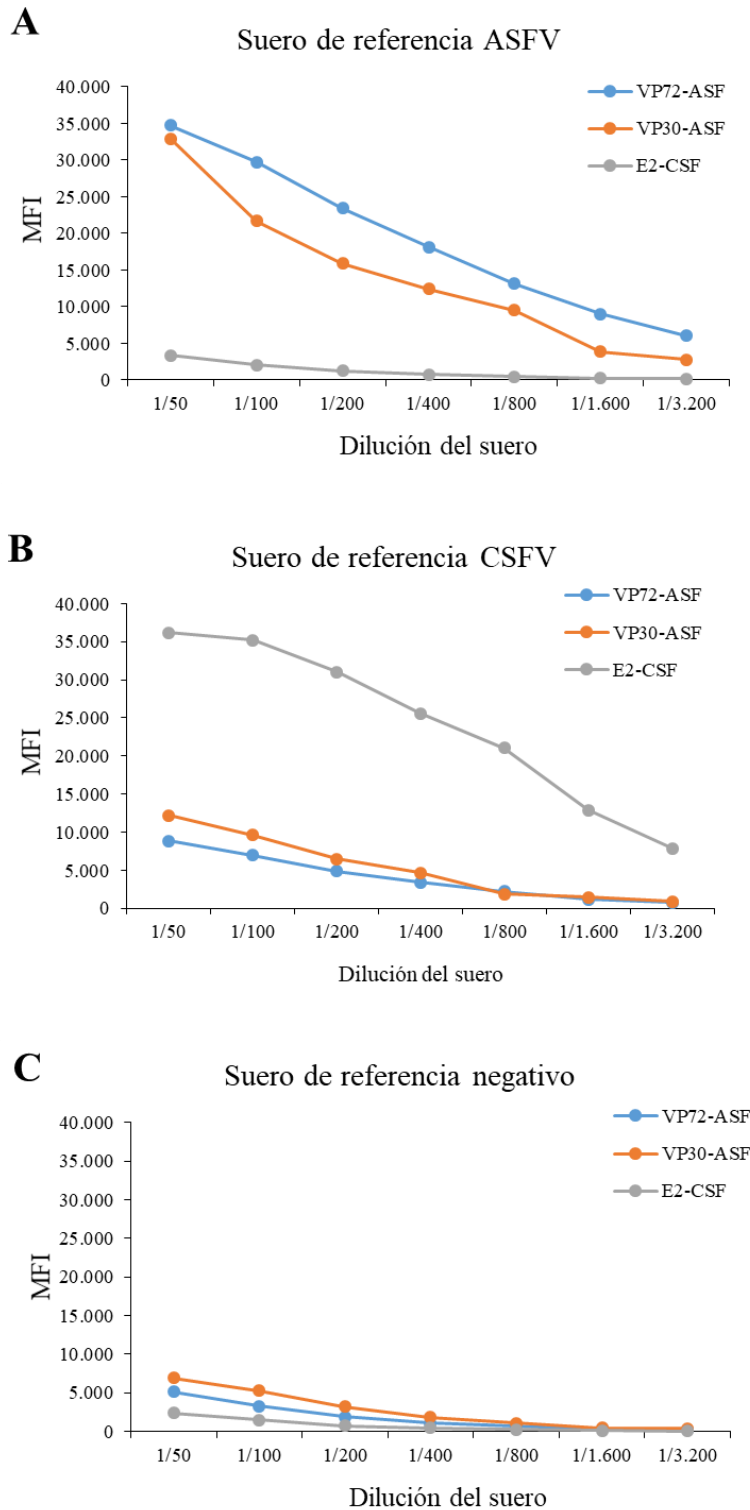
## **IV. 4. Diseño y desarrollo de ensayos múltiples para la detección de anticuerpos frente a patologías de interés epidemiológico en ganado porcino**

En este trabajo, se empleó la tecnología de microarrays en suspensión (Luminex), en el desarrollo de ensayos múltiples para la detección simultánea de anticuerpos específicos frente a patógenos porcinos de gran interés, descritas por la OIE dentro del panel de patologías de vigilancia epidemiológica en ganado porcino.

### **IV. 4. 1 Desarrollo de un ensayo triple para la detección de anticuerpos frente a ASFV y CSFV**

En primer lugar, se llevó a cabo un ensayo triple para la detección simultánea y diferencial de anticuerpos frente a ASFV y CSFV, dos patologías con sintomatología indistinguible en el animal y de declaración obligatoria a la OIE. Para ello, como antígenos diana se utilizaron las proteínas VP72 y VP30 de ASFV y la proteína E2 de CSFV, por ser las más inmunogénicas de los virus y las dianas empleadas habitualmente en diagnóstico indirecto de estas patologías. Los antígenos, ya disponibles en el laboratorio, se unieron covalentemente a las distintas microesferas empleadas en la tecnología Luminex. Brevemente, la proteína VP72 se obtuvo mediante purificación con columnas de afinidad empleando el AcM 17DL3, a partir de un extracto celular inactivado. Las proteínas VP30 y E2 se obtuvieron de forma recombinante en células de insecto empleando el sistema de baculovirus y se purificaron a partir de la fracción celular insoluble [118, 192].

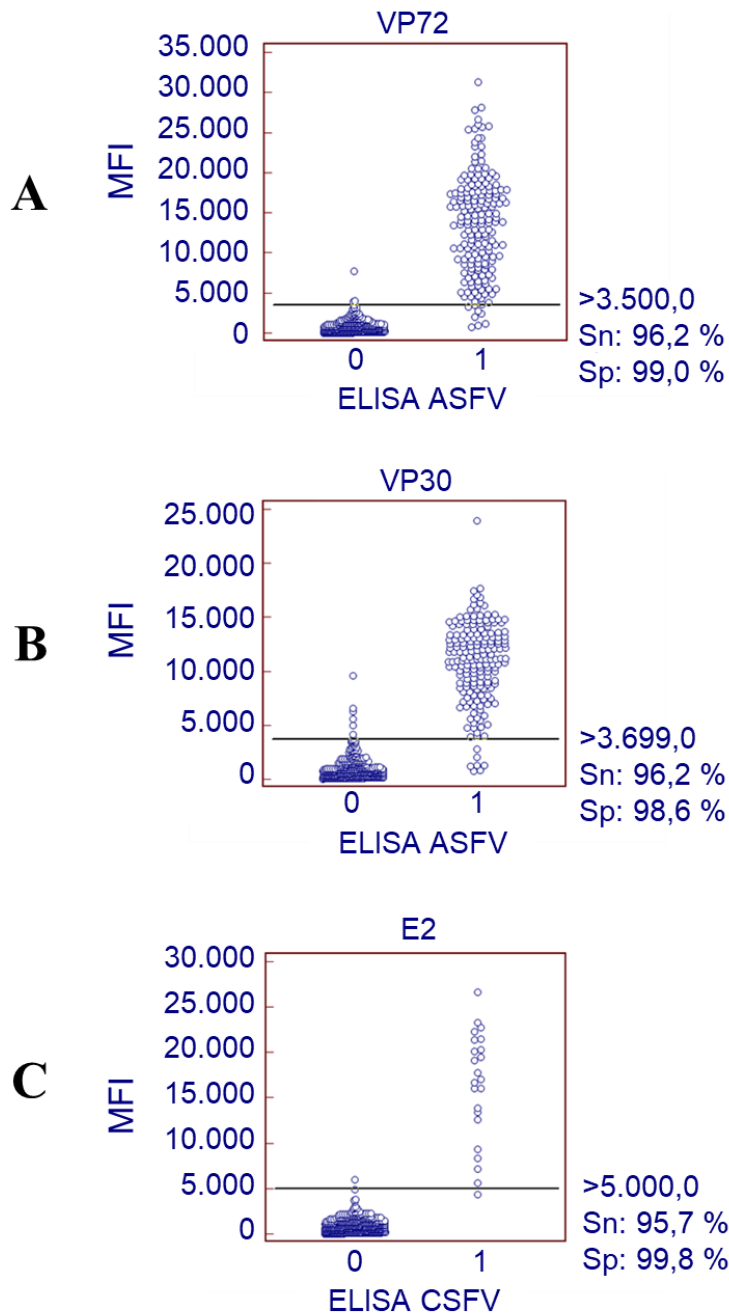
En una primera fase, se optimizaron las condiciones de inmovilización de los distintos antígenos a las microesferas. Para ello, se unieron distintas concentraciones de las proteínas diana a las microesferas, seleccionándose la menor concentración de proteína que daba las mayores señales en el ensayo de confirmación. Estas concentraciones fueron: 10 µg de VP72 por 10<sup>6</sup> microesferas (código #12), 5 µg de VP30/10<sup>6</sup> microesferas (#15) y 2,5 µg del antígeno E2 /10<sup>6</sup> microesferas (#25). A continuación, se establecieron las mejores condiciones del ensayo, para lo cual se procedió a realizar una dilución seriada de sueros de referencia de las distintas patologías y se analizaron frente a los tres antígenos en el ensayo triple [Figura IV.50].



**FIGURA IV.50 | Titulación de sueros de referencia en ensayo triple.** Dilución seriada de los sueros de referencia de las patologías ASFV (A), CSFV (B) y negativo (C), evaluadas con el ensayo de microarray en suspensión triple: en naranja se muestran los resultados obtenidos frente a la VP72 (región #12), en azul frente a la VP30 (región #15) y en gris frente a la proteína E2 (región #25). El eje de las ordenadas muestra los valores de intensidad media de fluorescencia (MFI) obtenida para cada punto. El eje de las abscisas muestra los valores de dilución del suero ensayados en cada punto.

En base a los resultados observados en la Figura IV.50, las condiciones óptimas se establecieron en la dilución 1/200 del suero en PBS con 1 % BSA, por ser el punto de máxima diferencia entre las muestras positivas y negativas con sus antígenos diana. En estas condiciones se procedió a analizar un total de 322 muestras de suero obtenidas de forma experimental en un estudio de vacunación de ASFV, 30 muestras de suero obtenidas en infecciones experimentales de CSFV y 257 muestras de suero de granjas españolas, libres de ASFV y CSFV. Las muestras fueron clasificadas como positivas o negativas mediante ensayos ELISA de competición comerciales (INgezim 11.PPA.K3 y INgezim 11.PPC.K3, para la detección de anticuerpos frente a ASFV y CSFV respectivamente), considerados en nuestro estudio como técnicas de referencia.

Las muestras se analizaron en las condiciones establecidas y los resultados de intensidad mediana de fluorescencia (MFI) obtenidos para cada región se analizaron mediante un ensayo de curva ROC con el software MedCalc, a fin de establecer los puntos de cortes óptimos para cada antígeno. En la Figura IV.51 se muestran las gráficas obtenidas para cada antígeno de forma independiente. Así mismo, en la Tabla IV.13, se muestra la información detallada del número de sueros caracterizados como positivo y negativo con cada una de las microesferas acopladas a los antígenos VP72, VP30 y E2, respectivamente, a fin de dar una información más detallada de las muestras discordantes (falsos positivos y falsos negativos).



**FIGURA IV.51 | Análisis mediante curva ROC de los resultados del ensayo triple ASFV/CSFV.**

Diagramas de puntos para selección del punto de corte óptimo tras análisis de curva ROC y parámetros diagnósticos asociados, en que cada punto muestra el resultado individual de una muestra obtenido de forma independiente con cada una de las regiones: microesfera 12 acoplada a la VP72 (**A**), microesfera 15 acoplada a la VP30 (**B**) y microesfera 25 acoplada a la proteína E2 (**C**). El eje de las abscisas muestra la clasificación de las muestras como positiva (**1**) o negativa (**0**). El eje de las ordenadas muestra la MFI de cada muestra independiente.

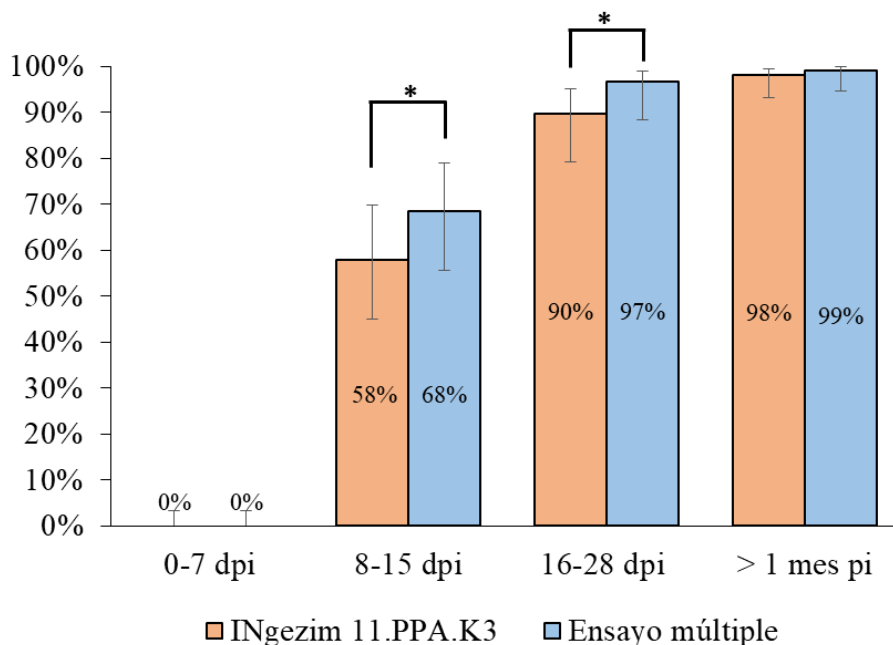
**TABLA IV.13** | Correlación entre el ensayo múltiple y los ELISA empleados como técnica de referencia

| No. de muestras caracterizadas en ELISA | No. de muestras caracterizadas en ensayo múltiple frente a la VP72 |          |       | No. de muestras caracterizadas en ensayo múltiple frente a la VP30 |          |       | No. de muestras caracterizadas en ensayo múltiple frente a la E2 |          |       |
|---|--|----------|-------|--|----------|-------|--|----------|-------|
|   | Positivo   | Negativo | Total | Positivo   | Negativo | Total | Positivo   | Negativo | Total |
| Positivo                                | 178  | 7        | 185   | 178  | 7        | 185   | 22   | 1        | 23    |
| Negativo                                | 4  | 416      | 420   | 6  | 414      | 420   | 1  | 581      | 582   |
| Total                                   | 182  | 423      | 605   | 184  | 421      | 605   | 23   | 582      | 605   |
| Sensibilidad                            | 96.2   |          |       | 96.2   |          |       | 95.7   |          |       |
| Especificidad                           | 99.0   |          |       | 98.6   |          |       | 99.8   |          |       |

Para la detección de anticuerpos específicos frente a ASFV, se estableció como punto de corte una MFI de 3.500 frente a la VP72, y 3.700 para la detección de anticuerpos frente a la VP30. Con estos parámetros, se obtuvo una sensibilidad del 96,2 % para ambos antígenos y una especificidad del 99,0 % y 98,6 %, respectivamente [Figura IV.51A y 51B]. Más del 96 % (178/185) de las muestras clasificadas como positivas por la técnica de referencia exhibieron una señal positiva frente al antígeno VP72 y, más del 99 % (416/420) de las muestras clasificadas como negativas, dieron un resultado negativo en el ensayo múltiple. Cuatro de las muestras clasificadas como negativas dieron un resultado falso positivo al evaluarlas frente al antígeno VP72. De ellas, tres muestras se correspondían con sueros recogidos a días tempranos tras la infección y uno pertenecía a un suero positivo a CSFV. Así mismo, siete muestras clasificadas como positivas con la técnica de referencia dieron un resultado falso negativo frente al antígeno VP72. El antígeno VP30 exhibió un comportamiento muy similar. Más del 96 % (178/185) de las muestras clasificadas como positivas con la técnica de referencia, dieron un resultado positivo frente al antígeno VP30, detectándose siete muestras como falsos negativos. Más del 98 % (414/420) de las muestras clasificadas como negativas, dieron un resultado negativo frente al antígeno VP30, obteniéndose seis muestras con un resultado falso positivo. En el caso del antígeno VP30, todas las muestras que dieron un resultado positivo en el ensayo múltiple y habían sido caracterizadas como negativas con el ensayo de referencia, pertenecían a sueros de animales recogidos a días tempranos post-infección [Tabla IV.13].

## Resultados

Dado que ASFV es un virus muy complejo antigénicamente, el objetivo de incluir dos antígenos en el ensayo es aumentar la capacidad de detección del mismo. Si se evalúa de forma conjunta la reactividad de las muestras a la VP72 y a la VP30 y, considerando una muestra positiva aquella que dé un resultado por encima del punto de corte para cualquiera de los antígenos, más del 97 % (180/185) de las muestras clasificadas como positivas con la técnica de referencia son catalogadas como positivas en el ensayo múltiple, aumentando así la sensibilidad del ensayo hasta el 97,3 %. Del mismo modo, más del 98 % (413/420) de las muestras negativas se clasificaron como tal, dando lugar a una especificidad del 98,3 %. Seis de las siete muestras clasificadas como falso positivo pertenecían a días tempranos post-infección. Ante esta observación, se decidió evaluar las diferencias en cuanto al porcentaje de muestras positivas obtenidas con el ELISA y el ensayo múltiple en base al día post-infección de obtención de la muestra [Figura IV.52].



**FIGURA IV.52 | Análisis estratificado de las muestras de ASFV.** Porcentaje de muestras positivas a distintos tiempos post-infección obtenidas en base a la técnica ELISA empleada como referencia (Naranja) y al ensayo microarray en suspensión optimizado en este trabajo (Azul). El eje de las ordenadas muestra el porcentaje de muestras positivas detectadas en cada grupo. El eje de las abscisas muestra los distintos días post-infección agrupados de la siguiente forma: 0-7 dpi, 8-15 dpi; 16-28 dpi y más de un mes. Las barras de error muestran el intervalo de confianza del 95 % para cada grupo de datos. El valor de significancia estadística fue calculado aplicando un test de McNemar, \*  $p < 0.05$ .

Como se observa en la Figura IV.52, la mayor diferencia entre los dos ensayos se encuentra en el tramo de 8 a 15 dpi, en el que, con el ELISA usado como referencia, se

detectaron un 58 % del total de las muestras recogidas como positivas, mientras que con el ensayo microarray en suspensión, un 68 % de las muestras dieron un valor de MFI por encima del punto de corte. Así mismo, en el tramo de 16 a 28 dpi, el nuevo ensayo desarrollado detectó un 97 % de las muestras como positivas frente al 90 % que detectó el ensayo ELISA.

Para la detección de anticuerpos específicos frente al CSFV, el punto de corte se estableció en una MFI de 5.000 empleando el antígeno E2 [Figura IV.51C]. Así, el ensayo múltiple muestra una buena correlación con el test empleado como referencia, exhibiendo una sensibilidad del 95,7 %, con solo un falso negativo y una especificidad del 99,8 %, obteniendo un resultado falso positivo que se corresponde con uno de los sueros experimentales de ASFV extraído a los 59 días post-infección. Para llevar a cabo el estudio de reactividad cruzada entre los pestivirus CSFV, BDV y BVDV, en el análisis de muestras se introdujeron 4 muestras positivas a BDV y 2 muestras positivas a BVDV con elevados títulos de anticuerpos frente a dichos virus. En ningún caso se observó señal de MFI con la microesfera #25 acoplada al antígeno E2, descartándose la posibilidad de reactividades cruzadas entre ellos.

#### **IV. 4. 2 Desarrollo de un ensayo séxtuple para la detección de anticuerpos frente a *M. bovis*, SIV, PRRSV, HEV, ASFV y CSFV.**

Con el fin de desarrollar un ensayo diagnóstico que facilite la vigilancia epidemiológica en el sector porcino, se seleccionó el siguiente panel de patógenos de mayor interés para la industria de acuerdo con la OIE: ASFV, CSFV, PRRSV, SIV. También se incluyó la tuberculosis bovina, enfermedad de gran importancia en España por la continua transmisión que se produce entre animales salvajes (jabalíes) y domésticos (vacas, cerdos y otros animales de granja) dando lugar a una elevada prevalencia en el país [170, 198]. Por último, se introdujo en el panel séxtuple HEV, una patología de gran interés epidemiológico de la que se dispone de pocos datos acerca de su incidencia en el sector porcino. Para ello, se realizó una estancia en el instituto de enfermedades nuevas y emergentes (INNT) del instituto federal Friedrich-Loeffler (FLI), donde existía disponibilidad tanto de antígeno recombinante del virus, como de muestras y un ensayo validado con el que caracterizarlas.

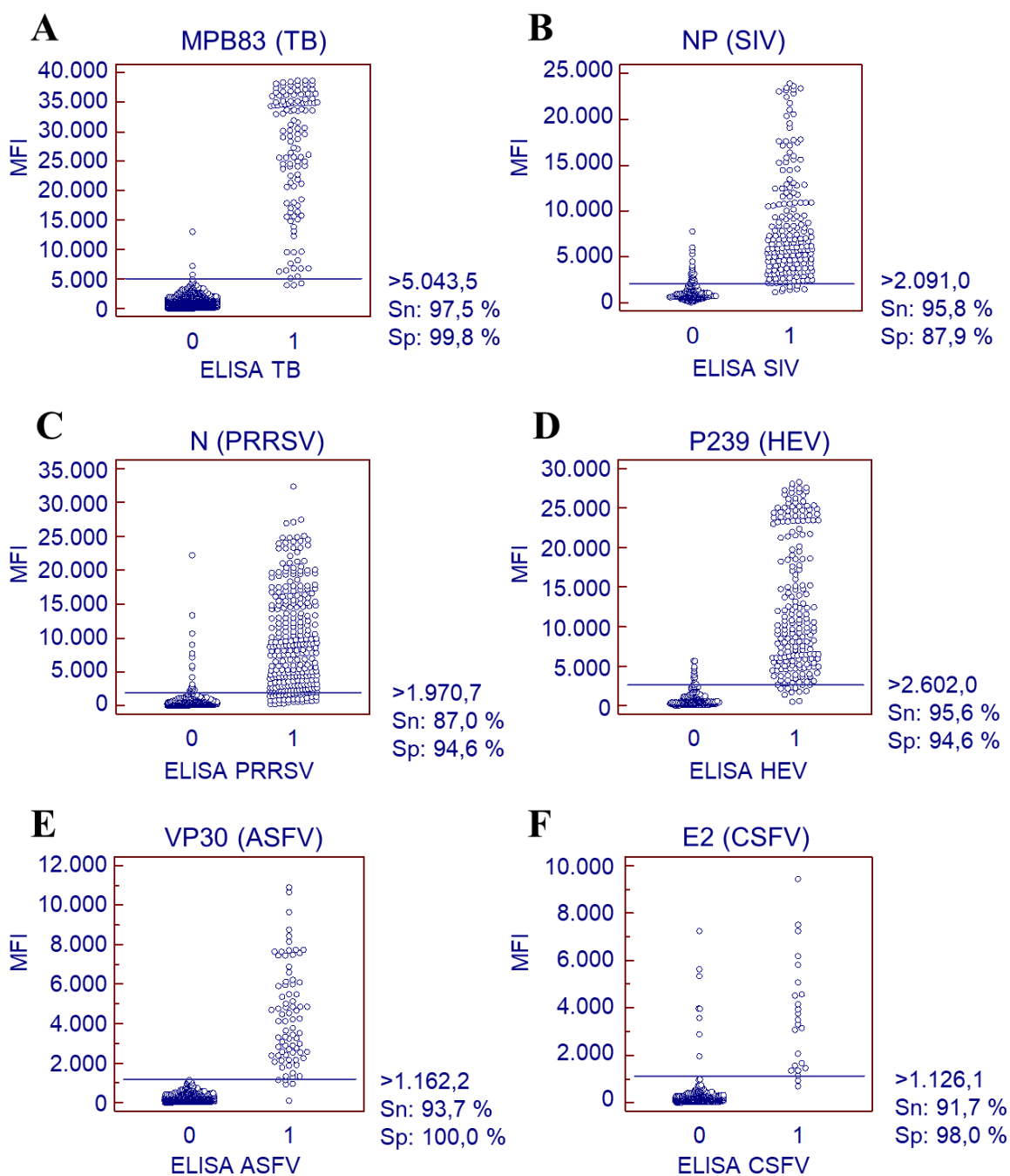
## Resultados

Tras haber demostrado que la proteína recombinante VP30 mostraba unos parámetros diagnósticos muy similares a la proteína VP72 empleada habitualmente en el diagnóstico de ASF y puesto que su producción es más sencilla, para el desarrollo del ensayo séxtuple, se utilizó exclusivamente la VP30 como antígeno diana.

En primer lugar, se acoplaron nuevas regiones de microesferas con los antígenos diana de las nuevas patologías incorporadas en el ensayo: para la detección de anticuerpos específicos frente a *M. bovis*, se empleó el antígeno GST-MPB83 producido en células de insecto [228], para PRRSV el antígeno P10-N de PRRSV-1 producida en *E. coli* [229], para SIV la 6xHis-NP producida en células de insecto. Por último, para la detección de anticuerpos frente al HEV, se acopló a las microesferas el antígeno P239 (ORF2) obtenido de forma recombinante en el sistema de *E. coli* en trabajos previos del FLI. Como condiciones óptimas se establecieron: 5 µg/millón de microesferas (#20) para la P10-N, 5 µg/millón de microesferas (#21) para la 6xHis-NP, 2,5 µg/millón de microesferas (#18) para la GST-MPB83 y 25 µg/millón de microesferas (#34) para la P239.

La adición de nuevos antígenos al ensayo hizo necesario realizar un reajuste de algunos parámetros; se reemplazó la BSA al 1 % por leche al 5 % (p/v) y se añadió Tween20 a una concentración final de 0,3 % (v/v) en el tampón de ensayo, para eliminar las reactividades cruzadas entre microesferas; se acortó el tiempo de incubación de los sueros y las microesferas a 30 min y se incorporó una nueva fase de bloqueo de las uniones libres de las microesferas en el proceso de inmovilización. En estas condiciones, se procedió al análisis de distintas colecciones de sueros. Para la caracterización de esas colecciones se emplearon los ELISA indirectos como referencia: INgezim 11.TBP.K.1 para la detección de anticuerpos específicos frente a *M. bovis*, INgezim 11.FLU.K.1 para la detección de anticuerpo monoclonales frente a SIV, INgezim 11.PR2.K.1 para la detección de anticuerpos monoclonales frente a PRRSV, un ELISA indirecto, no comercial, desarrollado en el FLI para la detección de anticuerpos frente a HEV y los ensayos comerciales ELISA de competición para la detección de anticuerpos específicos frente a CSFV (IDEXX) y ASFV (INgezim 11.PPA.K3). En la tabla III.7 se detallan las características de las muestras empleadas en el ensayo.

Para la determinación de los mejores puntos de corte, aquellas muestras que dieron valores intermedios de MFI en el ensayo múltiple se evaluaron mediante los ELISA empleados como técnica de referencia. Los resultados validados por ELISA de cada patología se analizaron mediante ensayo de curva ROC [Figura IV.53].



**FIGURA IV.53 | Análisis mediante curva ROC de los parámetros del ensayo séxtuple.** Punto de corte óptimo y parámetros diagnósticos asociados según análisis por curva ROC para la detección de anticuerpos frente a: **A.** *M. bovis* (TB), **B.** SIV, **C.** PRRSV, **D.** HEV, **E.** ASFV y **F.** CSFV. El eje de las ordenadas muestra los valores de MFI para cada muestra independiente. El eje de las abscisas muestra la clasificación de las muestras en positivo (1) o negativo (0) en base a los ELISA usados como técnica de referencia.

## Resultados

El ensayo desarrollado para la detección de anticuerpos frente a *M. bovis* muestra unos buenos parámetros diagnósticos, con una sensibilidad del 97,5 % y una especificidad del 99,8 % para el punto de corte establecido de 5.043 MFI [Figura IV.53A]. De todas las muestras clasificadas como positivas con el ELISA empleado como técnica de referencia (n=120), 117 dieron un resultado de MFI superior al punto de corte en el ensayo múltiple, obteniéndose tan solo 3 muestras con un resultado falso negativo. Así mismo, debido a que el origen de las muestras analizadas en el FLI eran granjas alemanas, país declarado libre de tuberculosis por la OIE [170], el resto de las 1.001 muestras analizadas en este instituto, y a pesar de que no todas se caracterizaron mediante ELISA, se consideraron negativas para la determinación de los parámetros del ensayo. De las 1.264 muestras negativas introducidas en el ensayo, tan solo 3 dieron un resultado falso positivo, determinando una especificidad total para el ensayo del 99,8 %.

Para la detección de anticuerpos frente a SIV, el punto de corte se estableció de acuerdo con el ensayo de curva ROC en 2.091 MFI, exhibiendo unos parámetros diagnósticos del 95,8 % de sensibilidad y 87,9 % de especificidad [Figura IV.53B]. En este caso, de las 1.001 muestras analizadas empleando el ensayo múltiple, las 391 muestras de suero que dieron unos valores de MFI intermedios fueron caracterizadas mediante el ELISA de referencia. Un total de 175 muestras de las 199 caracterizadas como negativas dieron el mismo resultado con el ensayo múltiple optimizado, obteniéndose un total de 24 muestras que dieron un resultado falso positivo en el ensayo de microarray en suspensión. Así mismo, de las 192 muestras clasificadas como positivas por la técnica de referencia, 184 dieron un resultado positivo en el ensayo múltiple; tan solo 8 muestras dieron un resultado falso negativo [Figura IV.53B].

En el caso de PRRSV, el punto de corte para el ensayo múltiple se estableció en 1.970, obteniendo una sensibilidad del 87,2 % y una especificidad del 95,2 % con las 574 muestras caracterizadas mediante el ensayo ELISA de referencia [Figura IV.53C]. De las 282 muestras caracterizadas como negativas con el ELISA empleado como técnica de referencia, 257 dieron también un resultado negativo con el ensayo múltiple. Así mismo, de las 292 muestras clasificadas como positivas, 261 dieron un resultado positivo con el microarray, 31 muestras positivas según la técnica de referencia dieron un resultado falso negativo con el ensayo múltiple.

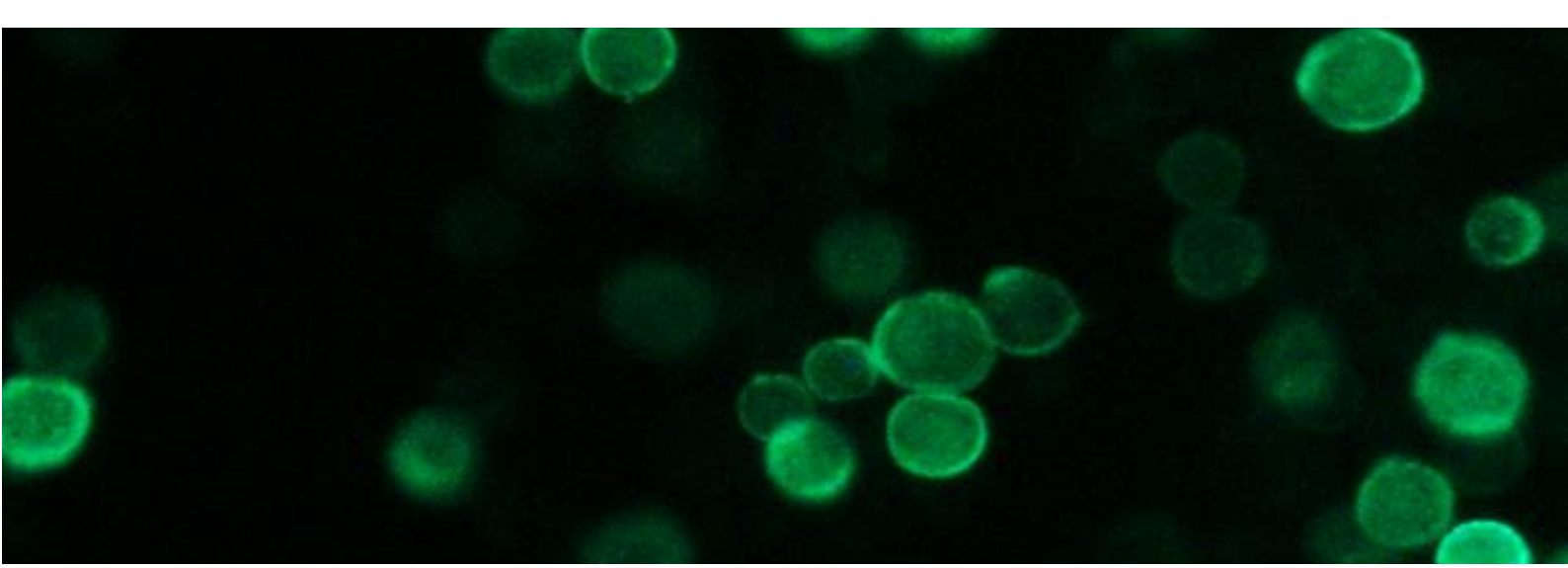
Para la detección de anticuerpos específicos frente al HEV no se disponía de ensayos comerciales para la evaluación de las muestras, por lo que se empleó el ELISA

puesto a punto en el instituto Friedrich-Loeffler como técnica de referencia. Las muestras se analizaron mediante el ensayo múltiple y, aquéllas que dieron unos valores de MFI intermedios, se evaluaron con el ELISA de referencia. De acuerdo con esta clasificación, el punto de corte para el ensayo se estableció en 2.602, dando paso a una sensibilidad del 95,7 % y una especificidad del 94,6 %. De las 221 muestras negativas analizadas con el ensayo de microarray en suspensión, tan solo 12 dieron un resultado falso positivo. Así mismo, de las 211 muestras caracterizadas como positivas, 202 dieron también un resultado positivo con el ensayo múltiple, obteniendo 9 falsos negativos [Figura IV.53D]. En base a los resultados obtenidos, se observó una seroprevalencia en ganado porcino para el HEV del 38,16 % [intervalo de confianza del 95 %: 35,20 % – 41,21 %] con 382 positivos de las 1.001 muestras analizadas.

En la determinación de los parámetros diagnósticos para la detección de anticuerpos específicos frente al ASFV en las nuevas condiciones, se incluyeron un total de 184 muestras experimentales de la colección disponible en Ingenasa, además de las 14 analizadas en el FLI. En las nuevas condiciones establecidas, el punto de corte para la detección de anticuerpos específicos frente a la proteína VP30 de ASFV se estableció en 1.162 exhibiendo una especificidad del 100 % y una sensibilidad del 93,9 % con un solo resultado falso negativo de las 13 muestras positivas incluidas en el ensayo en el FLI, y 4 falsos negativos entre las 69 muestras positivas analizadas en Ingenasa. Así mismo, entre las 1.103 muestras incluidas como negativas en el ensayo, no se obtuvo ningún resultado falso positivo [Figura IV.53E].

De acuerdo con el análisis mediante curva ROC, el punto de corte óptimo para el antígeno E2 se estableció en una MFI de 1.126 dando unos parámetros diagnósticos de un 91,7 % de sensibilidad y un 98,0 % de especificidad [Figura IV.53F], empleando como referencia el ELISA: IDEXX CSFV Ab Test. Los 8 resultados falsos positivos obtenidos se obtuvieron de infecciones experimentales con el CSFV, de sueros recogidos en su mayoría (6/8) a 21 días post-infección con valores de MFI superiores a 2.000. Otro de estos sueros se obtuvo a 96 días post-infección y, el último, a 926 días post-infección, en que, de acuerdo con uno de los resultados verdaderos positivos, los animales todavía pueden presentar anticuerpos.





# DISCUSIÓN



## V. Discusión

La industria porcina juega un papel clave en la economía, tanto española como mundial, llegando a suponer cerca del 15 % de la actividad industrial global y la fuente de ingresos de millones de personas en todo el mundo [1]. Ante la magnitud que esta industria representa para la economía global, se hace evidente la necesidad de garantizar el buen funcionamiento de las producciones porcinas, así como la sanidad animal y la seguridad alimentaria. Según directrices de la OIE y de la FAO, un punto clave radica en el control de los peligros biológicos dentro de las granjas con medidas de prevención y de actuación frente a posibles brotes [9].

A pesar de los continuos avances logrados en el campo de las enfermedades infecciosas con la erradicación de varios patógenos, éstas continúan teniendo un altísimo impacto en diversas áreas de la salud, incluyendo el área veterinaria. Como consecuencia, los brotes de enfermedades infecciosas generan enormes pérdidas económicas en la industria, siendo responsables de más del 20 % de las originadas en el sector porcino [11, 13]. En este contexto, surge el presente trabajo de tesis cuyo objetivo principal es el desarrollo de plataformas innovadoras para facilitar el diagnóstico de estas enfermedades y complementar los métodos actualmente disponibles, a fin de limitar su impacto.

Dentro de la gran diversidad de tecnologías para la detección de patógenos, los inmunoensayos han ganado relevancia desde la invención en 1971 de los ensayos por inmunoabsorción ligados a enzima (ELISA) [87, 88]. La ventaja principal de esta tecnología radica en su principio de reconocimiento, que, al basarse en la reacción antígeno-anticuerpo, dota a los inmunoensayos de una gran sensibilidad, especificidad y versatilidad, ya que variando el diseño permite tanto el diagnóstico directo (detección de proteína del patógeno) como indirecto (detección de anticuerpos específicos generados de forma natural frente al patógeno). Además, se trata de una técnica segura que no requiere grandes equipamientos, ni personal altamente cualificado para su realización. Actualmente, los ELISA son los ensayos empleados de rutina en muchos laboratorios de diagnóstico animal junto con la PCR [89, 90]. Durante las últimas décadas, han ido surgiendo alternativas para maximizar la implantación de estos inmunoensayos en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. En este trabajo se han desarrollado métodos empleando algunas de estas tecnologías innovadoras como son los **aptámeros** y el

**diagnóstico múltiple** a través de microarrays en suspensión, tanto para el desarrollo de métodos de diagnóstico directo como indirecto.

Por un lado, los métodos de diagnóstico directo basados en la detección de antígeno permiten la identificación inequívoca de una infección en curso, facilitando la aplicación de un tratamiento efectivo y jugando un papel clave en el control de brotes. En el presente trabajo se ha abordado la investigación y puesta a punto de métodos de detección directa tanto para enfermedades digestivas como respiratorias empleando aptámeros como molécula capturadora (ensayos ELASA). Los aptámeros presentan múltiples ventajas para dicho objetivo: se seleccionan íntegramente *in vitro* sin necesidad de utilizar animales de experimentación, se obtienen mediante síntesis química garantizando la reproducibilidad entre lotes, son fácilmente modificables y se pueden seleccionar en condiciones no fisiológicas.

El Rotavirus porcino tipo A (PRVA) es un patógeno digestivo de distribución ubicua, capaz de causar diarreas severas, tanto en cerdos como en humanos y varias especies de aves y mamíferos. Un parámetro importante a tener en cuenta para establecer la prevalencia y la severidad del cuadro clínico generado es la edad del animal, puesto que estos virus tienen un mayor impacto en lechones, en los que la inmunidad aún no está bien establecida. Estudios epidemiológicos recientes estiman que hasta el 89 % de las muestras clínicas analizadas en laboratorios de diagnóstico porcino contenían PRVA. El cuadro clínico de la infección por PRVA es similar a los causados por otros virus entéricos como PEDV y TGEV, de modo que las pruebas de laboratorio son esenciales para el diagnóstico. La presencia del virus puede evidenciarse tanto en muestras del contenido estomacal como intestinal y, a pesar de las crecientes alternativas, la técnica de diagnóstico directo por excelencia continua siendo la RT-PCR [126, 230]. Sin embargo, la PCR es una técnica cara, que requiere de complejas etapas de purificación del material genético y solo puede ser realizada por personal altamente cualificado. Por todo ello, en el presente trabajo, se ha investigado en el desarrollo de un ensayo para detección de antígeno en muestras fecales empleando aptámeros como biorreceptores, a fin de mejorar la sensibilidad de los inmunoensayos comerciales existentes y aumentar su aplicación en el área diagnóstica. Dentro de las proteínas del virus, la VP6 fue seleccionada para el desarrollo de moléculas biorreceptoras, por ser la más conservada dentro de los Rotavirus porcinos del grupo A, con menos del 13 % de divergencia a nivel de aminoácidos y,

además, por ser la proteína estructural más abundante de la cápsida, con 780 copias por partícula viral [125, 231].

La proteína VP6 se logró obtener exitosamente en ambos sistemas de expresión empleados en el presente trabajo: bacterias (*E. coli*) y células de insecto (BVES). Debido a que la VP6 es la única proteína que constituye la cápsida viral intermedia, se evaluó el potencial de las nuevas proteínas recombinantes para formar estructuras cuaternarias similares a virus del tipo VLP. Para conseguirlo se siguieron dos aproximaciones. Por un lado, la proteína se expresó de forma extracelular en células de insecto a fin de favorecer el paso por la ruta de glicosilación de proteínas. La proteína resultante mostró un aumento del peso molecular esperado (44 kDa), de aproximadamente 6 kDa (50 kDa). Un aumento secuencial, que se aprecia en la diferencia de peso molecular entre la proteína presente en las fracciones celulares (soluble e insoluble) de las células Sf900 y la fracción extracelular [Figura IV.9] y que se debe, como se comprobó por tinción de azúcares (tinción de ácido periódico-Schiff), a una glicosilación de la proteína de interés. Sin embargo, al observar por microscopía electrónica la proteína extracelular (AcGP67+VP6) purificada mediante columna de afinidad, se comprobó que no era capaz de formar estructuras cuaternarias complejas, más allá de la observación de proteínas globulares que serían compatibles, según bibliografía, con trímeros de VP6 [232], y que podrían corresponderse en tamaño molecular con la banda de más de 100 kDa observada en la purificación [Figura IV.10]. Al aplicar el protocolo de purificación por ultracentrifugación sobre colchones de sacarosa a la proteína recuperada en la fracción celular insoluble de células Sf9, se comprobó que la proteína VP6 sin modificaciones post-traduccionales era capaz de formar estructuras cuaternarias. Como se muestra en la Figura IV.11, la proteína VP6 autoensambló en forma de nanotúbulos de 75 nm de diámetro, que mostraron en su superficie un motivo geométrico idéntico al observado en fotografías de microscopía electrónica del rotavirus porcino [Figura I.11], previamente descritos en bibliografía por Lepault *et al.* [232]. Dichos autores describieron los polimorfismos de la proteína VP6 en función de las condiciones de pH y fuerza iónica aplicadas durante la purificación de la proteína recombinante, que fue capaz de dar paso, no solo a nanotúbulos de 75 nm de diámetro como los obtenidos, sino también a nanotúbulos de 45 nm de diámetro y partículas similares a virus (VLPs). Estudios previos han mostrado que la infección de células de insecto con baculovirus recombinantes para la expresión de la proteína VP6, induce la formación de estructuras compatibles con nanotúbulos en el citoplasma de las células [233].

Tras evaluar la inmunogenicidad de las distintas proteínas frente a un suero de referencia de PRVA, se comprobó que las proteínas producidas en células de insecto mostraban una mejor respuesta inmunológica que las obtenidas en bacterias. Concretamente, aquellas proteínas sometidas a un mayor procesamiento post-traduccional: la proteína glicosilada y la proteína estructurada en nanotúbulos, mostraron las mayores señales en ELISA indirecto. La sobreexpresión de proteínas recombinantes en células de *Escherichia coli*, supone una carga metabólica inabordable para las células, lo que hace que, en muchos casos, las proteínas adquieran una estructura terciaria y cuaternaria parcial o no adquieran estas estructuras. Estas proteínas no estructuradas dan paso a la formación de agregados en el citoplasma habitualmente conocidos como cuerpos de inclusión. La formación de cuerpos de inclusión tiene ventajas en la obtención de proteínas recombinantes, ya que facilita los procedimientos de purificación y permite obtener altos rendimientos de las proteínas de interés. Sin embargo, la purificación de la proteína recombinante a partir de ellos requiere la aplicación de procesos de solubilización, lo que compromete la adquisición de una estructura terciaria y cuaternaria correcta [234]. Uno de los protocolos de solubilización habitualmente empleado es el descrito en el apartado III.2.7.1.1 del presente trabajo, basado en el uso del surfactante aniónico N-lauril sarcosina (sarcosilo), que favorece la ruptura de uniones no covalentes entre proteínas y presenta la capacidad de formar micelas [235]. De este modo, el tratamiento de los cuerpos de inclusión o fracciones celulares insolubles con sarcosilo, podría dificultar la formación de estructuras complejas, justificando que las proteínas purificadas por ese protocolo muestren una peor actividad biológica. Así, a través de las purificaciones llevadas a cabo con dicho protocolo, se obtendrán proteínas menos estructuradas que son reconocidas de forma menos eficiente por el suero de PRVA. Múltiples revisiones a lo largo de las últimas décadas han evidenciado las ventajas que presentan los péptidos de fusión en la obtención de proteínas recombinantes; facilitando la purificación, aumentando la solubilidad de las proteínas, favoreciendo la adquisición correcta de una estructura terciaria... [236]. En el presente trabajo, estas ventajas se han evidenciado en la obtención de la proteína recombinante VP6, que solo se logró expresar en células de bacteria al expresarla acoplada a los péptidos de fusión: GST y 6xHis.

A pesar de que estudios previos han mostrado una mayor inmunogenicidad de la VP6 estructurada en nanotúbulos [237], en nuestros resultados, la proteína que mostró un mayor reconocimiento inmunológico en ELISA indirecto fue la proteína glicosilada (AcGP67+VP6). Esta observación evidenciaría que en la inmunidad frente al PRVA, los

azúcares de la glicoproteína VP6 podrían tener un elevado poder inmunogénico en el organismo, como se hipotetizó en las investigaciones de Cornaglia *et al.* [238], ya que según análisis computacionales, la proteína presenta 4 posibles sitios de glicosilación [239]. Esta observación podría llegar a explicar, de investigarse en mayor profundidad, por qué las vacunas basadas únicamente en esta proteína recombinante no confieren una inmunidad total a la infección por Rotavirus A, y tienen que combinarse con la proteína VP2 o virus inactivado [230].

La única purificación de la proteína VP6 en la que se observó un motivo estructural similar al observado en fotografías de microscopía electrónica del virus nativo, fue en la obtenida por ultracentrifugación sobre colchones de sacarosa, dando paso a una proteína estructurada en nanotúbulos, que fue la proteína que se empleó como diana para la obtención de aptámeros específicos. En el presente trabajo, se seleccionaron 4 aptámeros específicos para el desarrollo de ensayos diagnósticos, que se usaron en combinación con anticuerpos monoclonales para optimizar un ensayo tipo ELASA para la detección de antígeno en muestras fecales. El ELASA optimizado mostró unos valores de sensibilidad analítica inferiores a los obtenidos con el DAS-ELISA comercial (INgezim 10.RT.K2). Al proceder al análisis de muestras de campo, este parámetro se confirmó y, aunque el ensayo mostraba una buena especificidad, tan solo se logró obtener un 40 % de sensibilidad comparado tanto con la RT-qPCR como con el DAS-ELISA empleado como referencia. Así mismo, los valores máximos obtenidos con el ELASA no superaron los 0,27 de Absorbancia a 450 nm ni en aquellas muestras que mediante ELISA exhibieron Absorbancia de más de 3. Para el caso de la detección de antígeno en muestras de heces, el DAS-ELISA convencional mostró unos mejores parámetros diagnósticos (100 % de sensibilidad comparado con la RT-qPCR) que la alternativa empleando aptámeros como moléculas captadoras.

En el caso de PRVA, todas las muestras empleadas para la detección fueron muestras fecales. Estas muestras son bastantes complejas y están formadas por una amplia variedad de compuestos de todo tipo de naturaleza química tales como compuestos fenólicos, glicógeno, grasas, celulosa, componentes de células bacterianas, etc, que pueden actuar como potenciales contaminantes, inhibiendo la detección del virus por interferencia en el reconocimiento o por degradación de las moléculas captadoras. Estos problemas se han tratado de solventar en técnicas como la PCR mediante la eliminación o inactivación de estos componentes, así como mediante la introducción de controles

intrínsecos en las muestras evaluadas [240]. De este modo, la baja señal obtenida con el ELASA desarrollado podría explicarse debido a las interferencias que dichos compuestos generen en la interacción de la partícula viral del PRVA y el aptámero 9.3R empleado como molécula capturadora. O bien a que, al tratarse de una molécula de ADN, pueda sufrir procesos de degradación en presencia de las muestras de heces.

De los resultados obtenidos en el presente proyecto, se concluyó que los aptámeros, generalmente, requieren de unos mayores tiempos de incubación con la muestra. En el caso del desarrollo de ensayos para la detección de rotavirus porcino, las muestras de heces empleadas para la detección directa no permitieron prolongar estos tiempos de incubación más allá de una hora, por observarse un aumento en las señales de muestras negativas. Teniendo esto en cuenta, el funcionamiento observado en el ensayo ELASA para detección de rotavirus porcino es posible que se deba a la imposibilidad de optimizar de forma apropiada el ensayo cuando se emplea este tipo de muestra como matriz para la detección.

Los agentes más habituales que se encuentran en las granjas causando las infecciones primarias asociadas al complejo respiratorio porcino son: PRRSV, PCV2, SIV y *Mycoplasma hyopneumoniae*, lo que les convierte en patógenos clave para el control de este síndrome [10, 135]. Las técnicas más empleadas actualmente para el diagnóstico de estos cuatro patógenos se basan en la amplificación por PCR de regiones conservadas en el genoma de los mismos, por lo que muestran las mismas limitaciones descritas para el diagnóstico temprano de PRVA: complejidad de la tecnología y coste. La toma de muestras para la detección de este tipo de patógenos respiratorios puede llevarse a cabo, bien del tracto respiratorio superior, tomando muestras de hisopos nasales o traqueales, o bien, del tracto respiratorio inferior, con muestras de lavados o hisopos broncoalveolares, que son más complejas de obtener y más invasivas, pero resultan más representativas de los agentes patógenos que afectan a los pulmones del animal [241, 242]. En este aspecto, uno de los objetivos del presente trabajo ha sido el desarrollo de métodos ELASA optimizados para este tipo de muestras, que pueden facilitar la detección en estadios tempranos de los agentes que aparecen causando las infecciones primarias en el PRDC.

En el caso de SIV, la proteína seleccionada para el desarrollo de métodos diagnósticos fue la NP, por ser la proteína más conservada entre los distintos virus Influenza A que afectan a ganado porcino, permitiendo así la detección de todos los subtipos del virus [243]. La NP recombinante se obtuvo en células de insecto, observando tras la purificación una doble banda que era reconocida específicamente por el anticuerpo monoclonal anti-NP 3DH6 obtenido previamente mediante inmunización de animales de experimentación con el virus completo. Las dos bandas se correspondían con unos tamaños moleculares aproximados de 59 kDa, el tamaño esperado para la proteína, y 63 kDa, 4 kDa por encima del peso molecular observado de la NP. El vector AcGP67, empleado para la obtención extracelular de esta proteína, contiene la región codificante del péptido señal de la glicoproteína gp64 de baculovirus, que queda en fase con el gen de interés. De esta forma, la proteína se expresa fusionada a este péptido señal, que es reconocido por la célula y dirige a la proteína por la vía de secreción celular, llegando al medio de cultivo una versión procesada de la misma. El tamaño molecular del péptido gp64 es de 4,1 kDa, de modo que la obtención de la doble banda de los tamaños descritos podría explicarse por un procesamiento parcial de la proteína recombinante, obteniendo dos productos en la purificación: 6xHis-NP (59 kDa) y gp64-6xHis-NP (63 kDa). Debido a que ambas proteínas eran reconocidas de forma específica por el anticuerpo monoclonal 3DH6, dicha purificación de proteína se empleó para la obtención de aptámeros, seleccionándose de forma exitosa 3 aptámeros frente a la NP de SIV. Entre los aptámeros obtenidos mediante la tecnología SELEX, aquellos que presentan una secuencia rica en guaninas tienen la habilidad de formar motivos estructurales conocidos como G-cuádruples. Los motivos G-cuádruples constituyen una clase única de estructuras dentro de los ácidos nucleicos, en forma de hélice cuádruple, que se han relacionado en moléculas naturales con procesos de regulación y señalización, como en el ADN telomérico, o en promotores [244, 245]. Los motivos G-cuádruples presentan un gran polimorfismo, su base es una tétrada de guaninas y puede estar formado por diversos números de planos y con distintas orientaciones de la cadena de ADN, pudiendo ser tanto intramolecular como intermolecular [246]. Desde el punto de vista de la aplicación de los aptámeros al ámbito diagnóstico, la mayor utilidad de estas estructuras es la protección que confieren frente a la degradación por nucleasas. Lo que implica, que la estabilidad de esas moléculas será superior a la de las moléculas de ADN que no presenten este tipo de motivos, alargando la vida media de los diagnósticos desarrollados con ellas.

De los tres aptámeros seleccionados frente a la NP de SIV, el mejor candidato en base a la caracterización de las moléculas parecía ser el aptámero 6.2F, por tener la menor constante de afinidad por la proteína de todas las moléculas seleccionadas, y presentar en su estructura un motivo G-cuádruple de dos planos. Sin embargo, al trabajar en la optimización del ensayo ELASA, el aptámero que mejores resultados exhibió como molécula capturadora fue el aptámero 6.2R. Esta diferencia puede deberse, bien a que la molécula 6.2R presente un comportamiento distinto al variar el formato del ensayo, pues se pasa de un ensayo en formato ELONA a un ELASA tipo sándwich, donde la molécula captura a la proteína directamente; o bien, a que en el desarrollo de este tipo de ensayos no solo es relevante el valor de afinidad ( $K_d$ ) obtenido por la proteína diana, sino también el valor máximo de Absorbancia al que permite llegar la molécula ( $B_{max}$ ), puesto que el aptámero 6.2R, aunque presenta menor  $K_d$  (mayor afinidad), presenta la mayor  $B_{max}$  de las tres moléculas obtenidas, lo que puede convertirle en el mejor candidato.

Empleando el aptámero 6.2R como capturador en combinación con el anticuerpo monoclonal 3DH6 conjugado a peroxidasa, se consiguió optimizar un ensayo ELASA que presentaba un límite de detección de 62,5 ng/ml de NP recombinante (6,25 ng/pocillo). El ensayo se evaluó con muestras de hisopos nasales obtenidos de campo, y se obtuvieron unos buenos parámetros diagnósticos con una sensibilidad cercana al 80 % y una especificidad del 98,1 %, detectando solamente un falso positivo entre las 53 muestras negativas introducidas en el ensayo. Así mismo, se observó que la pérdida de sensibilidad se producía de forma principal en las muestras de mayor valor de Ct, obteniendo una sensibilidad del 55 % en muestras con un Ct superior a 30 y un 63 % en muestras con un Ct comprendido entre 25 y 30, no obteniéndose ningún resultado falso negativo en el grupo de muestras con un Ct inferior a 20. Considerando que la gripe porcina es una enfermedad altamente contagiosa entre los animales que comparten espacio, la pérdida de muestras con carga viral baja no supone un grave problema para la aplicabilidad del ensayo, pues al realizar un estudio del estado de salud de los animales permitiría detectar sin problema la infección en la granja. Actualmente las campañas de vigilancia de SIV se realizan mediante RT-qPCR, a partir de la mezcla de muestras de varios animales, para identificar Influenza A y, seguidamente, se procede a determinar el linaje con una de las muestras. La aplicación del ELASA en la primera fase de muestreo para identificar la presencia del virus, reduciría costes y facilitaría la realización de análisis masivos. Además, la implementación del ELASA en esa etapa, permitiría

seleccionar aquellas muestras con mayores señales en el ELASA, que por consiguiente tendrían una mayor carga viral, para la determinación posterior del linaje.

Como se ha comentado, la NP de SIV es una proteína altamente conservada, por lo que la pérdida de sensibilidad en las muestras no puede justificarse por la variabilidad del antígeno diana. Así mismo, aunque se observa que la tendencia a detectar antígeno de SIV mediante ELASA, aumenta a medida que disminuye el ciclo umbral (Ct) obtenido en la PCR, en ocasiones se obtienen resultados falsos negativos en muestras de Ct = 20 y, en contraposición, valores elevados de Absorbancia a 450 nm en muestras de Ct = 36. Considerando estas observaciones, la justificación más probable de pérdida de sensibilidad es la presencia de contaminantes, no identificados en este estudio, que interferirían en la detección viral, sobre todo, en muestras con una carga viral media-baja, pero que no serían tan relevantes cuando la carga viral de la muestra es muy elevada. Estos contaminantes no interferirían en la RT-qPCR debido a las etapas previas de purificación del ARN genómico. La pérdida de sensibilidad puede deberse también a que en el proceso de conservación de las muestras hasta su análisis las proteínas detectadas en ellas sufran procesos de degradación o desnaturalización, lo que impediría el correcto reconocimiento del patógeno de interés. Así mismo, cabe destacar que las muestras empleadas en la determinación de los parámetros diagnósticos del ELASA fueron muestras obtenidas en estudios previos, y almacenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso, lo que puede afectar al reconocimiento específico del patógeno.

Ante los buenos resultados obtenidos durante la estandarización del ELASA, los parámetros diagnósticos se evaluaron en un ensayo interlaboratorio, analizando un grupo de 24 muestras en tres laboratorios de forma simultánea. Este estudio arrojó unos valores de sensibilidad diagnóstica del ensayo de entre el 68,4 % y el 89,5 %; superiores incluso a los determinados en el primer análisis de muestras. Sin embargo, fue necesario reconfirmar la especificidad analizando mayor número de muestras negativas, debido a que en el estudio solo se introdujeron 4 muestras negativas y, una de ellas dio un resultado falso positivo en los tres laboratorios.

Los resultados falsos positivos obtenidos podrían ser debidos a problemas técnicos durante la realización del inmunoensayo, como pueden ser un mal lavado de los pocillos de la placa de microtitulación, que da paso a la unión a la placa de impurezas que favorecen la unión inespecífica de los anticuerpos secundarios, o a contaminaciones cruzadas entre muestras. Estas circunstancias podrían ser responsables de las diferencias

## Discusión

en cuanto a especificidad obtenidas entre el CICAP y el resto de laboratorios involucrados en el ensayo, pero no explicarían el claro falso positivo obtenido en la misma muestra en los tres laboratorios. Algunas muestras pueden contener impurezas que induzcan una unión inespecífica en el ensayo y, dado que en el trabajo se han empleado muestras de hisopos nasales, la matriz puede presentar grandes variaciones de un animal a otro que induzcan, en casos concretos, resultados falsos positivos [247, 248] o podría deberse a una mala caracterización inicial de la muestra, ya que no se pudo reconfirmar el resultado de la PCR por carecer de muestra suficiente. Al determinar los parámetros diagnósticos de un nuevo ensayo, es también crucial conocer estos mismos parámetros de la técnica empleada como referencia, para asegurar la idoneidad de los valores obtenidos. En nuestro caso, la RT-qPCR es una tecnología altamente específica y sensible, aunque podría reconocer contaminaciones cruzadas. Las muestras que dieron unos valores de Absorbancia a 450 nm de 3 dentro del grupo  $>30$  de Ct, puede deberse a una mala determinación inicial del ciclo de amplificación por encima del corte, ya que a partir de 30 los valores de Ct son poco reproducibles.

Para la detección de antígeno de *M. hyopneumoniae*, se seleccionó la proteína de superficie P46, un antígeno inmunodominante en la respuesta inmunológica al patógeno y que permite el diagnóstico diferencial de otros micoplasmas [149]. Esta bacteria tiene un uso de codones particular, por lo que para conseguir expresarla en los distintos sistemas de expresión se sintetizó un gen sintético adaptado al uso de codones de *Spodoptera frugiperda*. Esta proteína recombinante se obtuvo con un rendimiento bajo en los dos sistemas de expresión empleados (bacteria e insecto) y en ambos casos, la proteína se obtuvo de forma mayoritaria en la fracción celular soluble. La proteína que exhibió un mejor comportamiento en el desarrollo de inmunoensayos fue la proteína obtenida en el sistema heterólogo de *E. coli*. A diferencia del resto de patógenos estudiados, que son en su mayoría virus que utilizan en su totalidad la maquinaria celular para la expresión de sus proteínas, *M. hyopneumoniae* es una bacteria parásita que puede proliferar en un entorno no celular. Estas bacterias necesitan a las células de mamífero para la obtención de determinados componentes esenciales en su crecimiento que aún no están bien caracterizados, pero llevan a cabo la biosíntesis de sus proteínas estructurales y funcionales, entre otros. Por ello, a pesar de tratarse de un patógeno parásito de células de mamífero, podría justificarse que una proteína obtenida en el sistema de bacterias, de mayor proximidad evolutiva con el patógeno nativo, muestre un mejor comportamiento biológico [147].

Empleando los AcMs disponibles en el laboratorio, se consiguió optimizar un ensayo DAS-ELISA para la detección de antígeno en muestras respiratorias. Debido a que *M. hyopneumoniae* es un patógeno intracelular que no lisa las células en su ciclo biológico, en dichas muestras, el patógeno de interés se encontraría, presumiblemente, en el interior de las células obtenidas del tracto respiratorio. Las primeras pruebas realizadas reforzaron esta teoría, arrojando unos valores de sensibilidad deficientes, debido a que no fue posible detectar la presencia de patógeno en ninguna de ellas. Por este motivo, hubo que trabajar exhaustivamente en el proceso de preparación de las muestras para poder utilizarse en los ensayos diagnósticos. Los mejores resultados para la detección del patógeno en muestras del tracto respiratorio se obtuvieron tratando las muestras mediante protocolos de ruptura celular mecánica: sonicación o incubación en presencia de microesferas de circonio. Ningún tratamiento químico igualó los resultados obtenidos mediante las técnicas mencionadas. El ensayo DAS-ELISA se evaluó con un total de 105 muestras de hisopos traqueobronquiales y lavados bronquioalveolares tratados mediante sonicación, de los cuales 90 habían sido caracterizados previamente como positivos con la técnica empleada como referencia, la qPCR. Los hisopos nasales no se pudieron emplear en este tipo de ensayos por no tener suficiente carga viral para la detección. *M. hyopneumoniae* es un patógeno intracelular que afecta a las células epiteliales del pulmón y que, como se ha comentado previamente, no llega a lisarlas, por lo que la cantidad de bacterias que lleguen al tracto respiratorio alto, será más limitada que en otros patógenos estudiados, como SIV, explicando la baja sensibilidad reportada en técnicas tan sensibles como la qPCR cuando se emplean hisopos nasales [249]. En estas condiciones, el ensayo DAS-ELISA mostró unos valores de sensibilidad del 86,7 % y un 80,0 % de especificidad. Sin embargo, el hecho de que la mayoría de los resultados se encontraran entorno al valor de Absorbancia establecido como punto de corte de 0,2, y que no se obtuvieron resultados por encima de 0,8, compromete el desarrollo de un método diagnóstico, por lo que, en estas condiciones, no se procedió a su adaptación final como producto comercial.

Empleando como molde la proteína P46 del patógeno nativo homogeneizado, se seleccionaron 3 aptámeros específicos con buenos parámetros de afinidad por la proteína de interés. Dichas moléculas se emplearon para la optimización de un ensayo tipo ELISA para la detección de antígeno en muestras del tracto respiratorio. El mejor candidato para el desarrollo de dicho ensayo ELISA fue el aptámero 17R modificado mediante un grupo amino para el recubrimiento directo de los pocillos de placas de poliestireno, en combinación con el anticuerpo monoclonal 1B9H1 marcado con peroxidasa. El ELISA

## *Discusión*

se optimizó con dichas moléculas y mostró una sensibilidad analítica muy superior a la obtenida con el ensayo DAS-ELISA, que pasó de 20 ng/ml (2 ng/pocillo) a 1,2 ng/ml (0,12 ng/pocillo), utilizando en este análisis el antígeno obtenido en bacterias. Para la determinación de la sensibilidad analítica no se pudo emplear el antígeno nativo obtenido de un homogeneizado, por presentar un comportamiento altamente dependiente de lote y unos resultados muy variables incluso dentro del mismo homogeneizado. Al evaluar este ensayo ELASA con el mismo grupo de muestras analizadas en DAS-ELISA, se obtuvieron unos parámetros diagnósticos muy similares entre ambos ensayos, observando un leve incremento en el valor de la sensibilidad del ELASA, que pasó de un 86,7 % a un 92,2 % manteniendo el mismo parámetro de especificidad del 80 %. A pesar de la leve mejora obtenida con el ensayo ELASA, los valores absolutos de Absorbancia de las muestras clasificadas como positivas no sufrió un cambio importante, no superándose en ningún caso valores de Absorbancia de 1 para ninguna de las muestras ensayadas, y observando la mayoría de los resultados en valores entorno al punto de corte. Por otra parte, el protocolo de preparación llevado a cabo para la lisis celular dificultaría su aplicación para el análisis de grandes cantidades de muestras, aumentando considerablemente el trabajo y el tiempo necesario hasta la obtención del resultado.

El problema de sensibilidad para la detección de este patógeno, podría ser debido también a que, aunque la proteína P46 es una proteína de membrana inmunodominante en la detección de anticuerpos específicos frente al patógeno [250], puede que no se encuentre en niveles suficientes para la detección de las bacterias presentes en la muestra. Así mismo, los micoplasmas son bacterias de crecimiento lento que no alcanzan unos niveles muy elevados dentro de las células a las que infectan. El número de copias de la proteína P46 en cada microorganismo es mucho menor que el de las proteínas virales estructurales formadoras de cápsida, que pueden presentar más de 700 copias, como sucedía con la proteína VP6 de PRVA. Esta diferencia no supone una gran limitación para la tecnología empleada como referencia, la PCR, pues la amplificación del material genético permite la detección de un bajo número de moléculas, pero sí supone una dificultad para la detección de antígeno. Ante este problema, para la obtención de unas señales suficientes en el ensayo, sería necesario amplificar más la señal de la enzima detectora de forma específica, sin que aumenten los valores de las muestras negativas. Para ello, algunas de las alternativas que podrían barajarse en el futuro serían incluir otros anticuerpos detectores dirigidos frente a otras proteínas del patógeno que aumenten la reacción de la peroxidasa en los pocillos en que se ha inmovilizado el patógeno o aplicar

estrategias de amplificación de la señal, como es el uso de polímeros de peroxidasa que aumenten el número de moléculas de peroxidasa inmovilizada, el marcaje de los anticuerpos mediante fluorescencia o modificar los marcajes de peroxidasa por biotina para incorporar otra fase de incubación con estreptavidina-peroxidasa, considerando que todas estas modificaciones deberían ser optimizadas de forma que se mejorasen las señales positivas minimizando la señal obtenida con muestras negativas [89].

En el caso de PCV2, se seleccionó la única proteína estructural del virus, la proteína de la cápsida, que es, además, la proteína más conservada dentro de los Circovirus porcinos tipo 2 [153]. La proteína Cap no se logró expresar en el sistema heterólogo de bacterias con ninguna de las cepas productoras de *E. coli* y, solo se observaron unos niveles de expresión residuales, en la construcción que presentaba un péptido de fusión de 6xHis. Esta observación puede deberse a que la proteína forme de forma espontánea estructuras tipo VLP en el citoplasma de las células, resultando tóxico para la bacteria o una carga metabólica inabordable, que se vería ligeramente reducida al introducir un péptido de fusión en el extremo amino terminal, un dominio involucrado directamente en la formación de la cápsida [251]. Así mismo, la observación de bajos niveles de expresión de la proteína recombinante en el sistema de expresión heterólogo de bacterias puede deberse a una degradación proteolítica de la proteína de interés, o a procesos de agregación debidos a la sobreexpresión, que favorecen la eliminación de la proteína recombinante [252]. Sin embargo, la proteína Cap recombinante se expresó con unos rendimientos muy elevados en células de insecto, obteniendo 9 mg de proteína por cada  $10^6$  células infectadas, obteniendo la proteína en la fracción celular insoluble. Aplicando el protocolo de ultracentrifugación sobre colchones de sacarosa, se consiguieron obtener VLPs de PCV2 del tamaño esperado y con una pureza muy elevada, observándose una única proteína por SDS-PAGE.

Empleando las VLPs purificadas, se seleccionaron 3 aptámeros específicos con unos parámetros de afinidad excelentes por la proteína diana, que se encontraban por debajo del rango nanomolar, entre 188 y 276 pM [Tabla IV.7]. El aptámero 6.10F, mostró la mayor afinidad teórica por su antígeno diana de todos los aptámeros seleccionados en este trabajo, con un valor de 0,1885 nM; sin embargo, su valor de  $B_{max}$  fue menor que los obtenidos con los aptámeros 6.10R y 6.5R, que mostraron unas Absorbancias máximas a 405 nm en ELONA superiores a 2. Así mismo, el aptámero 6.10R presentó una elevada tasa de uniones entre pares de bases, así como la capacidad de formar dos

estructuras G-cuádruples en la molécula, una de dos planos y otra de tres planos, con lo que sería una molécula altamente estable para el desarrollo de ensayos diagnósticos. La obtención de unos aptámeros con características tan prometedoras para la detección de la proteína recombinante de interés, puede deberse a que esta proteína se pliega adquiriendo una estructura tridimensional idéntica a la del virus, facilitando su autoensamblaje en forma de VLPs, lo que no se garantizó aplicando otros protocolos de purificación. Esta observación demostraría que, para llevar a cabo una buena selección de aptámeros funcionales, es imprescindible que la proteína empleada como diana se obtenga con un elevado grado de pureza y en una conformación, lo más parecida a la estructura nativa que adopta la proteína en el virus o en el patógeno diana.

En el proceso de optimización de los ensayos ELASA, tanto el aptámero 6.10R como el 6.5R mostraron un comportamiento muy similar en su capacidad de detectar las VLPs, de modo que se decidió seguir trabajando con el aptámero 6.10R por mostrar una mejor estabilidad teórica. El aptámero 6.10F se descartó por mostrar una sensibilidad demasiado baja por las VLPs en formato ELASA para el desarrollo de métodos diagnósticos. En este caso, los mejores parámetros diagnósticos, se lograron con la modificación de los aptámeros empleando un grupo biotina y posterior recubrimiento de pocillos de placas de estreptavidina, obteniendo mayores señales de Absorbancia a 450 nm con las VLPs de PCV2, a una concentración de recubrimiento 4 veces inferior (50 nM) a la empleada con los aptámeros modificados con un grupo amino (200 nM). Como se ha descrito previamente en bibliografía y se muestra en la Figura IV.34, el PCV2 es un patógeno intracelular cuyo mecanismo patológico es la formación de sincitios y que, por tanto, no llega a lisar las células. Por este motivo, en las primeras aproximaciones, diluyendo la muestra en el mejor tampón de ensayo establecido con las VLPs, no se consiguió detectar la presencia del patógeno en las muestras positivas. De modo que se decidió aplicar un tratamiento de ruptura celular como en el caso de *Mycoplasma hyopneumoniae*. Tras probar diversos tratamientos químicos, se determinó que la incubación de las muestras con el tampón de lisis celular descrito por Dhabaria *et al.* [226] para estudios de proteómica, y posterior dilución en tampón de ensayo, era un protocolo prometedor para la detección del PCV2 en muestras de campo de hisopos bronquiales. Sin embargo, al aplicar este tratamiento a un mayor número de muestras, la elevada composición de detergentes del tampón y los dos pasos necesarios de dilución que reducían la concentración de virus, ya poco abundante en la muestra, interferían en el

reconocimiento, dando paso a unos valores diagnósticos inadecuados, con falta tanto de sensibilidad como de especificidad diagnóstica.

Por último, el PRRSV es un patógeno altamente variable en que el gen codificante de la proteína de la nucleocápsida presenta una alta variabilidad tanto entre especies como dentro del mismo grupo [159]. Por este motivo, en este caso concreto, se emplearon como antígenos recombinantes las proteínas de la nucleocápsida de ambas especies, PRRSV-1 y PRRSV-2, así como una proteína quimera formada por la unión mediante una secuencia de glicinas de la proteína N de ambas especies. Las distintas proteínas se obtuvieron en trabajos previos del laboratorio empleando el sistema heterólogo de *E. coli*, seguido de un protocolo de purificación a partir de los cuerpos de inclusión bacterianos. Para asegurar la detección de cualquier especie de PRRSV mediada por aptámeros, se empleó como molde para la selección la proteína de la nucleocápsida quimera. En total, se seleccionaron de forma exitosa 3 aptámeros específicos frente a la proteína N de PRRSV que mostraban unos parámetros de afinidad superiores por la proteína de PRRSV-2 (4-40 nM), que por la de PRRSV-1 (28-106 nM).

Los resultados obtenidos mediante ensayo ELONA para determinar los parámetros de afinidad de los aptámeros se reprodujeron al evaluar su capacidad de capturar la proteína recombinante, mostrando una sensibilidad mayor por la proteína de PRRSV-2 que por la de PRRSV-1. Para el desarrollo de ensayos ELASA, la mejor estrategia fue la modificación de los aptámeros con un grupo biotina en el extremo 5' y posterior recubrimiento sobre placas de estreptavidina. Tanto el aptámero 6.8R como el aptámero 6.14F mostraron unos resultados de sensibilidad analítica idénticos de, aproximadamente 20 ng/ml para la proteína N de PRRSV-2 (1,9 ng/pocillo), y de 39 ng/ml (3,9 ng/pocillo) para la N de PRRSV-1. El ensayo desarrollado se evaluó en condiciones saturantes de recubrimiento con un grupo de 41 muestras positivas y negativas, para evaluar la capacidad del ensayo de reconocer el antígeno nativo, obteniendo unos parámetros prometedores para un ensayo en vías de optimización, con un 89,5 % de sensibilidad y un 72,7 % de especificidad. Ante estos resultados, se procedió a optimizar el ensayo ELASA para garantizar una buena especificidad manteniendo valores de sensibilidad diagnóstica elevada. Así, fue necesario reducir la concentración de recubrimiento de las placas de ELASA, ajustar la dilución del anticuerpo detector y adaptar el protocolo de tratamiento de las muestras para que los resultados fueran reproducibles. En estas condiciones, se determinó que el ensayo ELASA no era capaz de detectar al PRRSV en

## *Discusión*

muestras de sangre ni de fluidos orales. Esta observación puede deberse a que la concentración del virus en estas localizaciones es muy inferior a la encontrada en sus órganos diana como son los pulmones, o bien, a que en estas muestras haya algún componente contaminante que no aparecen en los hisopos bronquiales y lavados bronquioalveolares, y que actúan inhibiendo o interfiriendo en la interacción del virus con cualquiera de los dos aptámeros seleccionados: el 6.8R o el 6.14F. En caso de evaluar la sensibilidad del ensayo ELASA únicamente en muestras de lavados broncoalveolares o hisopos bronquiales, el ensayo desarrollado exhibió una sensibilidad del 72,5 % y una especificidad del 100 %. Aunque ambos aptámeros mostraron unos parámetros diagnósticos idénticos, los valores de Absorbancia a 450 nm obtenidos con el 6.14F fueron más prometedores para el desarrollo de nuevos ensayos diagnósticos que los obtenidos con el aptámero 6.8R, aunque para ambas moléculas se obtuvieron valores de Absorbancia muy elevados en muestras concretas. El ensayo mostró la capacidad de detectar de forma indistinta diversos aislados de PRRSV, tanto de PRRSV-1 como de PRRSV-2 sin observarse una sensibilidad marcadamente superior por el aislado de PRRSV-2. Ante esta observación, se determinó que los parámetros de afinidad y sensibilidad analítica del ELASA, que indicaban que el ensayo desarrollado tendría mayor capacidad de detectar aislados de PRRSV-2, se debió a un artefacto producido por los diferentes protocolos de purificación aplicados a la proteína N de PRRSV-1 y PRRSV-2, que se explicarían porque la proteína de la segunda especie muestra una estructura más similar a la nativa. Sin embargo, el valor de sensibilidad obtenido en un pequeño grupo de muestras, junto con la necesidad de emplear placas de estreptavidina que acortan la caducidad máxima del ensayo, imposibilitó el desarrollo del ELASA como un producto comercial.

Cabe destacar que, en el presente trabajo, las muestras a las que se ha tenido acceso han sido obtenidas de colecciones recogidas en las condiciones óptimas para la determinación de la carga viral mediante PCR, por lo que, probablemente, la adaptación del protocolo de toma de muestra para los hisopos bronquiales en este caso y nasales para SIV, resuspendiendo el contenido total del hisopo directamente en el tampón de muestra, evitaría la necesidad de diluir las muestras y mejoraría tanto el valor de sensibilidad como las señales de Absorbancia obtenidas con las distintas muestras.

Los aptámeros han mostrado ser grandes herramientas para complementar el papel de los anticuerpos, llegando en algún caso a mejorar los parámetros obtenidos con los

ensayos DAS-ELISA, presentando múltiples ventajas: son más fáciles y rápidos de obtener que los anticuerpos y permiten la fácil renaturalización de las moléculas captadoras. Durante la optimización de los ensayos ELASA tipo sándwich para detección de antígeno en muestras orales, un punto limitante ha sido el acceso a un volumen suficiente de muestra al que aplicar diversos tratamientos en paralelo para la selección de las condiciones óptimas. Al emplear muestras de hisopos, los volúmenes obtenidos de las extracciones fueron muy limitados y requirieron de unas condiciones muy controladas de conservación de las mismas, a fin de garantizar el mantenimiento de las proteínas de los patógenos en matrices complejas.

De los experimentos llevados a cabo se puede deducir que para la optimización de un ensayo tipo ELASA, el tampón seleccionado para el recubrimiento de las placas con moléculas de aptámero es un parámetro crítico que condiciona la sensibilidad obtenida. Esta observación puede deberse a que, en función de la composición en bases nitrogenadas de los aptámeros, la fuerza iónica y el pH de la solución favorezcan una estructura secundaria y terciaria concreta en cada caso. Dado que el principio de reconocimiento del ELASA se basa en la estructura tridimensional adquirida por el aptámero, esa composición será clave para el mantenimiento de la estructura adoptada en el proceso de estructuración y, por tanto, para garantizar el reconocimiento de los motivos presentes en las proteínas del patógeno. Así mismo, la modificación de los aptámeros para favorecer su unión a las placas puede suponer un impedimento estérico importante para la adquisición de la estructura seleccionada en el proceso SELEX. En caso de que el extremo 5' quede en zonas internas de la molécula estructurada, la modificación de la molécula con un grupo grande como la biotina puede perjudicar al reconocimiento específico. Dado que los modelos de predicción empleados deducen probabilidad de formación de enlaces entre bases, pero no de la estructura tridimensional de la molécula, la modificación a emplear para recubrir los pocillos de las placas de microtitulación sigue siendo un proceso empírico.

A pesar de los esfuerzos realizados, no fue posible determinar la competición de los distintos aptámeros por un mismo epítipo, ni desarrollar un ensayo empleando únicamente aptámeros. Al añadir sobre una placa recubierta con una molécula de aptámero captador un segundo aptámero como detector, estas moléculas de ADN mostraban una mayor tendencia a asociarse entre sí que con la proteína añadida como

diana, dando paso a una señal inespecífica que aparecía inalterada independientemente de la proteína añadida.

Las proteínas obtenidas de forma recombinante, han mostrado una elevada utilidad en diversos campos y, concretamente, en el presente trabajo han mostrado su utilidad en el desarrollo de métodos diagnósticos. Los antígenos recombinantes garantizan una mayor reproducibilidad entre lotes, una respuesta similar a la de los patógenos nativos que se busca detectar y reducen los requerimientos de laboratorios de contención para el uso de los ensayos. A pesar de los avances realizados en los últimos años, el proceso de selección del sistema heterólogo óptimo continúa siendo un proceso empírico, en que la predicción de la toxicidad que las proteínas pueden generar sobre las células, la determinación de la estructura tridimensional que adquirirán tras la expresión y garantizar las modificaciones post-traduccionales de las proteínas sigue siendo un proceso poco controlado. Ante estos problemas, tecnologías como el sistema Gateway que facilitan el subclonaje en múltiples plásmidos tanto de expresión como de transferencia, favorecen la obtención de un antígeno funcional de una forma más rápida y eficiente.

Por último, de los presentes desarrollos se puede concluir que, para la optimización de ensayos diagnósticos directos, es imprescindible trabajar con muestras experimentales y de campo, ya que los resultados obtenidos con las proteínas recombinantes o las matrices contaminadas *in vitro* suelen no ser extrapolables a muestras reales. Al presentarse en las matrices biológicas, los virus y patógenos pueden establecer unas interacciones concretas con las células u otros componentes del organismo, así como presentar una localización celular determinada, que exijan de un determinado tratamiento de las muestras previa realización de los ensayos. En el presente trabajo de tesis fue necesario realizar una lisis celular previa para la detección de los patógenos intracelulares, *M. hyopneumoniae* y PCV2, a fin de permitir la interacción entre el patógeno y el aptámero empleado como molécula detectora.

Los anticuerpos monoclonales han mostrado ampliamente ser herramientas fundamentales para el desarrollo de inmunoensayos con valor diagnóstico y, aunque los aptámeros tienen un gran potencial complementando estos desarrollos, no se ha conseguido reemplazar por completo el papel de los anticuerpos [74]. En el presente trabajo, la tecnología de hibridomas se ha aplicado para la obtención de nuevos

anticuerpos monoclonales específicos por la proteína VP30 del virus de la peste porcina africana. La peste porcina africana es una importante enfermedad infecciosa que afecta a cerdos y jabalíes, domésticos y salvajes, de todas las edades manifestándose a través de una gran diversidad de síndromes [163, 198]. Desde el año 2016, se ha observado un aumento en la notificación de brotes de esta enfermedad, localizados principalmente en Europa (67 % de los casos), seguido de Asia, donde la enfermedad se detectó por primera vez en 2018 en China, y se ha transmitido rápidamente por todos los países del sudeste asiático [253]. A pesar de todos los esfuerzos realizados, no se ha logrado un control efectivo de esta enfermedad, por lo que, al no disponer de una vacuna eficiente, la única alternativa para minimizar los impactos económicos del ASFV es el diagnóstico temprano.

Como se muestra en la Figura I.15, ASFV es un virus complejo con una molécula de ADN genómico que codifica entre 150-167 polipéptidos, entre los que se encuentran muchas proteínas estructurales. Todavía no se ha identificado la composición exacta de cada una de las capas virales. La primera proteína que se describió como candidata al diagnóstico fue la VP72, cuyo gen codificante (B646L) es el empleado para la clasificación de los virus en genotipos. Desde su descripción en 1921, solo se han identificado 24 genotipos distintos de ASFV, por lo que no es un virus altamente variable. A medida que avanzó la investigación, se describieron otras proteínas estructurales, potenciales dianas para el diagnóstico. Entre ellas, la que ha suscitado mayor interés es la proteína VP30, que ha mostrado su utilidad en el diagnóstico indirecto a través de la detección de anticuerpos en distintos tipos de muestras (suero, saliva e incluso heces) [179, 254]. Por este motivo, a fin de ampliar las herramientas disponibles para la detección de la infección por ASFV, en el presente trabajo se empleó el antígeno VP30 para la obtención de anticuerpos monoclonales y el posterior desarrollo de estas herramientas en la aplicación al diagnóstico directo (*western blot*, inmunofluorescencia, DAS-ELISA) e indirecto (ELISA de competición).

Tras la fusión de linfocitos y células de mieloma, se consiguieron aislar tres líneas de hibridoma estables, productoras de anticuerpos monoclonales específicos por la VP30: 11G9, 13A12 y 13E12. Las tres líneas de hibridomas mostraron una buena adaptación al crecimiento en biorreactor, aunque con peores resultados en el caso del hibridoma 13E12. Aun así, fue posible purificar IgG a partir del medio de cultivo con todos los hibridomas. Las inmunoglobulinas purificadas se isotiparon como IgG1 y se caracterizaron mediante

## Discusión

distintas técnicas. En primer lugar, se determinó que las tres inmunoglobulinas reconocían dos epítomos distintos en el antígeno de interés, mostrando un solapamiento entre las IgGs 13A12 y 13E12 que, presumiblemente, reconocerían el mismo epítomo o epítomos próximos en la VP30. Mediante *western blot*, las tres IgGs mostraron una respuesta altamente específica por la proteína de interés, no observándose señales de reactividad cruzada con ninguna de las proteínas incluidas como control negativo.

La caracterización de los anticuerpos monoclonales mediante inmunofluorescencia sobre células de insecto infectadas en condiciones óptimas con el baculovirus recombinante AcHLTA+VP30 indicó que los tres anticuerpos monoclonales presentaban una señal específica con esta técnica, observando una señal menos intensa en las células infectadas con el anticuerpo monoclonal 11G9. No se observaron diferencias en el comportamiento de los anticuerpos monoclonales 13A12 y 13E12 en este ensayo, de modo que cualquiera de ellos podría llegar a ser un producto comercial para la detección del ASFV mediante esta tecnología. Debido a las implicaciones para la salud animal del ASFV, este patógeno debe ser manejado en laboratorios de contención biológica de nivel 3, no disponibles en Ingenasa, y, por tanto, no se han podido evaluar sobre células infectadas con virus nativo. En los próximos meses se tratará de llevar a cabo esta valoración en laboratorios con la seguridad biológica requerida.

Los nuevos AcMs se emplearon para desarrollar un ensayo DAS-ELISA que permitió detectar la proteína VP30 obtenida en el sistema de células de insecto (BVES). La mejor combinación se obtuvo al emplear el anticuerpo 11G9 conjugado a peroxidasa como detector junto con cualquiera de los otros dos AcMs, 13A12 o 13E12, como capturadores. En estas condiciones el ensayo exhibió una sensibilidad analítica prometedora, de 40 ng/ml.

El comportamiento de los anticuerpos en función del ensayo desarrollado, depende de varios parámetros: el isotipo de inmunoglobulina producida por los hibridomas, la afinidad de los anticuerpos por el antígeno y el estado del antígeno a evaluar. Estudios previos han demostrado que, para poder realizar de forma eficiente el marcaje de las inmunoglobulinas, es preferible trabajar con IgG que con IgM o IgA por su estructura monomérica. Así mismo, las IgG son las inmunoglobulinas más específicas por su antígeno en contraposición a las IgM que son moléculas con una avidéz muy elevada pero una menor especificidad al tratarse de moléculas más inmaduras [16, 255]. La experiencia previa del laboratorio ha evidenciado además que los hibridomas productores de IgG son

más estables que los productores de IgM, siendo los que más habitualmente se obtienen tras el proceso de aislamiento y selección de hibridomas. Al trabajar en técnicas como el *western blot*, los antígenos son tratados previamente mediante desnaturalización para ser separados por SDS-PAGE perdiendo su estructura tridimensional. De este modo, en este tipo de ensayos solo serán capaces de reconocer de forma específica sus antígenos aquellos anticuerpos que, como los seleccionados, reconozcan una secuencia lineal y no epítomos conformacionales en el antígeno [256]. Así mismo, la estructura que el antígeno tiene tras su purificación puede verse alterada con respecto a la que adopta en la célula Sf9, pudiendo ser una explicación al diferente comportamiento que el anticuerpo 11G9 presenta como detector en inmunofluorescencia y DAS-ELISA.

Los nuevos anticuerpos monoclonales obtenidos frente a la VP30 se emplearon para desarrollar un ensayo para la detección de anticuerpos específicos frente al ASFV en formato ELISA de competición. Para el recubrimiento de pocillos de placas de microtitulación, se empleó la proteína VP30 obtenida en células de insecto, puesto que mostraba un rendimiento muy superior a la proteína obtenida en células de *E. coli*, y a que su uso ha sido validado previamente en el laboratorio para la detección de anticuerpos específicos frente al ASFV en formato de ELISA indirecto. La diferencia principal entre un ensayo ELISA indirecto y ELISA de competición, radica en que en el primero, se detectan anticuerpos totales producidos frente al antígeno tapizado, mientras que en el segundo solo se evalúa la respuesta frente a un epítomo concreto, por lo que tiene que ser un epítomo mantenido y altamente inmunogénico en el animal. Empleando los anticuerpos 11G9, 13A12 y 13E12, no fue posible lograr un porcentaje de competición superior al 50 % con un suero positivo de referencia con un elevado título de anticuerpos, según caracterización previa mediante ELISA indirecto y mediante ELISA de competición empleando el antígeno VP72. Estudios previos obtenidos en varios laboratorios, incluido el nuestro, han demostrado que la proteína VP30 es una buena candidata para la detección de anticuerpos frente al ASFV [118, 179, 254, 257], por lo que el mal funcionamiento del ensayo no se debía a la selección del antígeno, sino a los epítomos reconocidos por los anticuerpos monoclonales seleccionados. Los anticuerpos obtenidos frente a la proteína VP30 no reconocen los epítomos que resultan ser más inmunogénicos en el animal, mostrando únicamente una interacción que dificulta parcialmente la unión de los anticuerpos detectores, pero no la impide. Esta observación puede deberse a que el antígeno empleado en la inmunización presentara una estructura distinta a la que presenta en el virus completo, al haberse obtenido en células de bacteria, exhibiendo unos epítomos

distintos al inmunizar a los animales de investigación. O a que la respuesta generada por los ratones sea predominante por otros motivos estructurales.

De los resultados obtenidos, se determinó que los nuevos anticuerpos monoclonales obtenidos no son buenas herramientas para la detección de anticuerpos específicos frente al ASFV, por reconocer unos epítomos ligeramente distintos a los reconocidos de forma natural en el animal. Sin embargo, mostraron ser buenas herramientas para el desarrollo de nuevos métodos para el diagnóstico directo de la infección, ya que en *western blot*, DAS-ELISA e inmunofluorescencia mostraron la capacidad de reconocer de forma específica y sensible a la proteína VP30 producida en un sistema heterólogo distinto al del antígeno empleado en la inmunización.

Por último, en el presente trabajo de tesis se ha abordado el desarrollo de ensayos de diagnóstico indirecto, que permiten detectar una inmunización frente al patógeno de interés meses después del contacto, siendo una herramienta fundamental para la realización de estudios epidemiológicos. Para poder llevar a cabo un buen diagnóstico de laboratorio es imprescindible realizar un escrupuloso análisis clínico, ya que los ensayos de laboratorio usados en la actualidad únicamente permiten detectar un patógeno en concreto. Esta limitación observada para el diagnóstico de laboratorio podría solventarse con la optimización de ensayos múltiples. Las herramientas de diagnóstico múltiple permiten detectar de forma simultánea la presencia de varios patógenos, por lo que no necesitan un examen clínico tan riguroso como los métodos individuales, permitiendo distinguir infecciones con cuadros clínicos similares en un único análisis y facilitando la aplicación de estudios epidemiológicos. Estos ensayos reducen los tiempos asociados al procesamiento de las muestras, así como el trabajo derivado de las evaluaciones y la necesidad de grandes volúmenes de muestras pues, en este caso concreto, 0,5 µl de suero es suficiente para evaluar la respuesta frente a 6 patógenos distintos. Al miniaturizar la superficie del ensayo, los ensayos múltiples pueden ser más sensibles que los correspondientes ensayos individuales y reducen la variabilidad pues el ensayo se realiza sobre, al menos, 50 microsferas de forma simultánea y diferencial, y se reduce la variabilidad comparada con la realización de varios ensayos independientes considerando el error humano, interensayo y de manejo de muestras [110, 111].

En el presente trabajo de tesis se han desarrollado dos ensayos múltiples. En primer lugar, se trabajó en la optimización de un ensayo triple para la detección simultánea y diferencial de anticuerpos frente a los virus ASFV y CSFV, dos patógenos de declaración obligatoria a la OIE e indistinguibles en evaluación clínica, ya que cursan con una sintomatología muy similar. Durante los últimos años, estos dos virus han causado múltiples brotes en diversas zonas geográficas, ampliando las posibilidades de que ambos virus aparezcan en una región de forma simultánea [170]. En ambos casos, dentro de Europa, la detección de anticuerpos frente a cualquiera de estos virus es un indicativo directo de infección, ya que para ASFV no se dispone de vacunas y para CSFV, la vacunación está prohibida en Europa para asegurar un control óptimo de la evolución de ambas enfermedades.

Dado que ASFV es un virus complejo, en el ensayo múltiple se introdujeron los dos antígenos más habitualmente empleados en diagnóstico: la VP72 y la VP30. Para la detección de anticuerpos frente al ASFV, ambos antígenos (VP72 y VP30) mostraron un comportamiento similar exhibiendo unos buenos parámetros diagnósticos ( $S_n$ : 96,2 % y  $S_p$ : 98,6 – 99,0 %). Así mismo, si consideráramos muestra positiva como aquella que reconociese a cualquiera de los antígenos utilizados, VP30 o VP72, la sensibilidad del ensayo aumentaría hasta el 97,3 %, con una especificidad del 98,3 %. De los 7 falsos positivos detectados con los dos antígenos en combinación, 6 se obtuvieron de animales a distintos días post-infección, principalmente en el rango de los 10 a los 15 días, lo que podría significar que el ensayo desarrollado es ligeramente más sensible que el ELISA usado como referencia para la detección de anticuerpos. Si los resultados obtenidos con estos sueros se consideraran como un incremento de sensibilidad en la determinación de los parámetros en lugar de falsos positivos, los parámetros diagnósticos del ensayo aumentarían hasta el 97,4 % de sensibilidad, perdiéndose 5 muestras positivas y 99,7 % de especificidad. Esta hipótesis se refuerza al observar en la Figura IV.52 que el ensayo múltiple detecta un 68 % de muestras positivas en el rango de 8-15 dpi frente al 58 % observado con el ELISA empleado como técnica de referencia, así como un 97 % en el grupo de 16-28 dpi frente al 90 % obtenido con el ELISA. El antígeno VP30 aparece como un gran candidato para el desarrollo de métodos diagnósticos ya que es un antígeno recombinante, que muestra los mismos parámetros diagnósticos con la mitad de concentración de proteína utilizada con respecto a la VP72. Para la detección de anticuerpos frente al ASFV en futuros desarrollos solo se incluirá la proteína VP30 por ser más reproducible y barata de obtener.

## Discusión

Por otro lado, para la detección de anticuerpos específicos frente al CSFV empleando el antígeno E2 se obtuvieron unos buenos parámetros diagnósticos con una sensibilidad del 95,7 % y una especificidad del 99,8 % obteniendo un único resultado falso positivo proveniente de un suero experimental de ASFV a 59 días post-infección que mostraba unos elevados niveles de inmunoglobulinas frente al ASFV, por lo que podría tratarse de una reacción inespecífica. El ensayo no mostró reactividades cruzadas con los otros *Pestivirus* incluidos en el estudio, BVDV y BDV, dos patógenos altamente relacionados antigénicamente con el CSFV que pueden aparecer causando infección en porcino.

Actualmente, a pesar de los esfuerzos realizados, no se dispone de una vacuna eficiente para erradicar la ASF [258]. En contraposición, se dispone de vacunas altamente eficaces y seguras para la erradicación de CSF, que han ayudado a que este virus se elimine de forma exitosa en muchos países a través de exhaustivos programas de control. Sin embargo, la vacunación frente al CSFV está prohibida a día de hoy en Europa, reservándose para casos extremos en los que la enfermedad no se pueda contener mediante las estrategias clásicas de cuarentenas y aislamientos, a fin de tener un mejor control epidemiológico del estado de salud general del porcino con respecto a esta enfermedad [259]. Con estas consideraciones, mediante la combinación de los tres antígenos, el ensayo triple desarrollado permitiría identificar la circulación de cualquiera de los dos virus en una granja facilitando el diagnóstico indirecto de estas enfermedades.

A continuación, el panel puesto a punto para la detección de anticuerpos frente a los patógenos ASFV y CSFV, se amplió añadiéndose los antígenos más relevantes para la detección de anticuerpos específicos frente a PRRSV (N) y SIV (NP) que, al igual que ASFV y CSFV, son patógenos de alta relevancia para la industria porcina que se incluyen entre las patologías de interés descritas por la OIE. Así mismo, se añadió un antígeno para la detección de anticuerpos específicos frente a *Mycobacterium bovis* (MPB83), un patógeno de gran relevancia para la industria porcina española por la elevada prevalencia detectada en animales salvajes de diversas familias animales que actúan como reservorios (ciervos, corzo, jabalí...) y que la convierten en una enfermedad endémica. Y, por último, se introdujo en el panel del ensayo la proteína P239 del HEV por ser un potencial patógeno enzoótico cuya vigilancia está ganando importancia en los últimos años.

Ante la importancia que todas estas enfermedades tienen para la industria porcina, el desarrollo de un ensayo múltiple que permita detectar anticuerpos de forma diferencial y simultánea frente a cualquiera de ellos permitiría desarrollar un único plan de vigilancia capaz de detectar el estado de inmunidad frente a un complejo panel de patógenos. Para poder discutir los resultados obtenidos en este apartado, es necesario hablar en primer lugar de los hábitos de vacunación llevados a cabo con respecto a cada uno de estos patógenos. En concreto, se evaluó la situación actual en España y en Alemania, países de origen de las muestras analizadas.

Como se ha comentado anteriormente, la detección de anticuerpos específicos frente a ASFV y CSFV es un indicativo directo de infección, ya que no se vacuna a los cerdos en las granjas salvo caso de emergencia, y aunque podría encontrarse algún animal vacunado frente a CSFV, no es un suceso habitual. Todas las muestras de campo analizadas fueron clasificadas como negativas frente a CSFV y ASFV con los ELISA empleados como referencia, por lo que se incluyeron muestras experimentales para la evaluación de los parámetros del ensayo. En el caso de la detección de anticuerpos específicos frente a ASFV en las nuevas condiciones establecidas, las señales medias de MFI se redujeron implicando una bajada del punto de corte a 1.090. Muchos de los sueros obtenidos a días tempranos post-infección no se encontraban disponibles cuando se llevó a cabo el ensayo séxtuple, por lo que la evaluación del ensayo múltiple se realizó con un grupo más reducido de muestras, manteniendo buenos parámetros de sensibilidad (93,9 %) y especificidad (100 %).

En el caso de la detección de anticuerpos frente al CSFV, y del mismo modo que sucedía con la detección de anticuerpos específicos frente al ASFV, el ensayo microarray en suspensión pareció mostrar un mejor parámetro de sensibilidad en las muestras experimentales obtenidas a 21 días post-infección, que se clasificaron como negativas empleando el ELISA de referencia. Considerando estas muestras como un incremento en la sensibilidad del ensayo, los parámetros diagnósticos obtenidos para la detección de anticuerpos frente al CSFV fueron del 100 % de especificidad, obteniendo tan solo dos resultados falsos negativos en muestras obtenidas en co-infecciones de CSFV con los *Pestivirus* BDV y BVDV, por lo que podría deberse en parte a una reactividad cruzada en ELISA. El ensayo múltiple para la detección de anticuerpos frente a CSFV no mostró reactividad cruzada con BDV ni BVDV.

En el caso de tuberculosis, no se dispone de vacunas comerciales para la vacunación frente a *M. bovis* en cerdos, y su detección en animales de cría intensiva no es habitual debido a su aislamiento del medio. Sin embargo, en aquellos animales que, como el cerdo ibérico, son criados en cría extensiva, en mayor contacto con la naturaleza, debido a que comparten espacio con animales salvajes en los que la tuberculosis es altamente prevalente, es más habitual encontrar anticuerpos frente a *M. bovis* [260]. Rara vez se identifica a esta bacteria por sus efectos patogénicos en el individuo, ya que la tuberculosis es una enfermedad lenta y, debido al tiempo de cría de los animales de, como mucho 1 año, no suele haber tiempo a que desarrollen una patología grave [261]. Los sueros de campo analizados provenían de granjas de cría intensiva alemanas, de modo que todos ellos fueron caracterizados como negativos con el ELISA de referencia. En estas condiciones, el ensayo desarrollado mostró una especificidad muy elevada con tan solo tres resultados falsos positivos entre las 1.264 muestras negativas de suero evaluadas con el ensayo múltiple. Así mismo, el ensayo exhibió una sensibilidad elevada del 97,5 %, detectando como falso negativo tan solo tres de las 120 muestras positivas introducidas en el ensayo. La microesfera optimizada para la detección de anticuerpos específicos frente a *M. bovis*, fue la que mayor punto óptimo de corte mostró, con un valor de 5.045, que puede deberse a que la infección por esta bacteria induce en los animales una fuerte respuesta humoral, detectando un mayor nivel de anticuerpos. Así mismo, la proteína MPB83 acoplada a la superficie de las microesferas se encontraba fusionada al péptido de fusión GST. Estudios previos han evidenciado que, en determinadas condiciones de enfermedad, pueden aparecer de forma normal niveles elevados en suero de anticuerpos específicos frente a este péptido de fusión [262, 263]. De este modo, los resultados falsos positivos obtenidos y los sueros más próximos al punto de corte observados en el ensayo podrían deberse a una señal cruzada de anticuerpos del animal capaces de reconocer el péptido de fusión GST, que también serían detectados por el anticuerpo revelador 1BH7. Para solventar este problema, en posibles optimizaciones del panel desarrollado podría introducirse una microesfera acoplada a GST con el objetivo de sustraer la señal producida por este péptido de la obtenida con la proteína MPB83, lo que podría implicar una mejora de ambos parámetros diagnósticos: especificidad al reducir los falsos positivos y sensibilidad en caso de que permitiera reducir el punto de corte óptimo establecido para la microesfera. O se podría trabajar con una proteína MPB83 que no contuviera este péptido de fusión.

El PRRSV es un virus cuya erradicación no ha sido viable por ser un proceso muy costoso y poco efectivo en el tiempo, ya que, tras la erradicación del patógeno en las granjas, éste puede reintroducirse a los pocos años por el manejo habitual, por ejemplo, con la introducción de nuevos reproductores en granjas de cría. El PRRS es una enfermedad de elevada prevalencia y que causa importantes pérdidas económicas a la industria porcina. Actualmente hay varias vacunas comerciales ampliamente utilizadas basadas en distintas cepas de PRRSV-1 vivo modificado, siendo las más empleadas: Porcilis PRRSV, MSD; SUVAXYN-PRRS-MLV, Zoetis y Pysrvac-183®, Syva. La estrategia de vacunación varía de unas granjas a otras encontrando piaras en las que se vacuna a todos los animales y otras en las que no se realiza vacunación a fin de emplear la detección de anticuerpos como un marcador diagnóstico y poder así detectar de forma temprana los brotes. Ante estas prácticas, la detección de anticuerpos no puede asociarse directamente con la infección por el virus, ya que dependerá de la estrategia seguida por cada granja. En el ensayo múltiple desarrollado, se empleó la proteína de la nucleocápsida de PRRSV-1 por ser la más prevalente en Europa y la especie más empleada en las principales vacunas. La detección de anticuerpos empleando la plataforma Luminex mostró unos parámetros diagnósticos del 87,0 % de sensibilidad y del 94,6 % de especificidad. En este caso, el sistema empleado como técnica de referencia es un ELISA indirecto que emplea la proteína quimera (N PRRSV-1 + N PRRSV-2) para la detección de anticuerpos frente a cualquiera de las dos especies del PRRSV de forma simultánea. Debido a la diferencia en el antígeno empleado en el reconocimiento, la bajada de la sensibilidad puede deberse a que, debido a la diferencia estructural de la proteína N, algunos de los animales detectados como positivos a anticuerpos específicos de PRRSV con el ELISA se deban a una infección con PRRSV-2, menos prevalente pero presente en Europa, y no sean detectados mediante el ensayo múltiple [158]. Debido a que los sueros de campo empleados en la evaluación del ensayo no son rastreables, solo se trata de una hipótesis que no se ha podido demostrar. Así mismo, los parámetros de sensibilidad y especificidad del ELISA empleado como referencia no son del 100 %. Este ELISA muestra una sensibilidad del 88 % comparado con la técnica de inmunofluorescencia indirecta, así como un 100 % comparado con el IPMA, técnica de referencia europea para la detección de anticuerpos. Así como un 97,2 % de especificidad en sueros obtenidos frente al PRRSV-1 y 93,2 % en sueros obtenidos frente al PRRSV-2. Al no disponer de información detallada, no se puede hacer una discusión más exhaustiva de los resultados, aunque, dados los parámetros diagnósticos del ELISA de referencia, sería posible que

## *Discusión*

algunos de los resultados falsos positivos y falsos negativos se deban a una clasificación poco precisa por parte de la técnica de referencia.

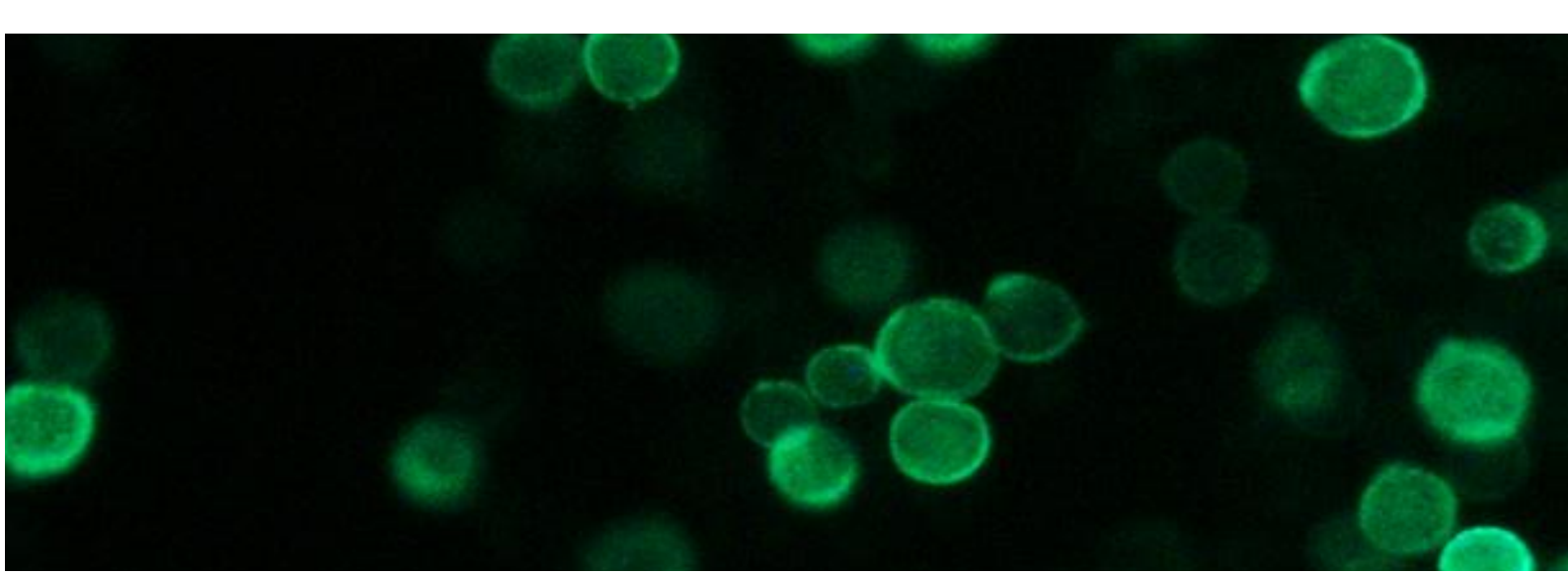
Con respecto a la influenza porcina, actualmente se dispone de una amplia gama de vacunas frente a la infección causada por el virus Influenza en aves y cerdos, pero no se ha conseguido desarrollar una vacuna universal que proteja frente a todos los subtipos del virus, teniendo que adaptar la vacuna cada pocos años [264]. A pesar de los avances realizados en este campo, las vacunas más ampliamente utilizadas para prevenir el SIV continúan siendo las basadas en mezclas de las cepas más abundantes del año anterior inactivadas, y la vacunación no se lleva a cabo de forma masiva más que en casos de cepas altamente patogénicas [265-267]. De modo que, al igual que sucedía con PRRSV, la presencia de anticuerpos frente a la NP de Influenza A no es evidencia inequívoca de un contacto con el virus. Dentro del ensayo múltiple desarrollado, la detección de anticuerpos específicos frente al virus Influenza A mostró unos parámetros diagnósticos del 95,8 % de sensibilidad y 87,9 % de especificidad. Debido a que las muestras evaluadas eran sueros de campo, no se disponía del historial de los animales para realizar una evaluación detallada del prototipo. Sin embargo, es relevante indicar que el ensayo usado como referencia es un ELISA indirecto que emplea como antígeno un homogeneizado de Influenza obtenido en cultivo celular. Este ensayo comercial muestra unos parámetros diagnósticos confirmados del 87 % de sensibilidad y 89 % de especificidad comparado con el ensayo indirecto de hemaglutinación. Estos valores de sensibilidad y especificidad podrían justificar algunos de los resultados falsos positivos y falsos negativos obtenidos en el ensayo múltiple por ser una mala clasificación del ELISA empleado como referencia.

Por último, la hepatitis E es una importante enfermedad zoonótica que puede causar graves problemas de salud en personas inmunodeprimidas, sobre todo en aquellos países con menos recursos. Actualmente se dispone de vacunas para el control de la infección por el HEV en humanos, pero su eficacia no se ha demostrado en animales. El control de este virus en cerdo, puesto que su transmisión se produce a través de alimentos contaminados, ayudaría al control de la enfermedad en personas [268]. Dado que la vacunación no se aplica en campo, la presencia de anticuerpos es indicativo de un contacto directo con el virus. En el caso de la detección de anticuerpos específicos frente al HEV se obtuvieron unos buenos parámetros diagnósticos del 95,7 % de sensibilidad y 94,6 % de especificidad. La diferencia principal entre el ELISA empleado como

referencia y el ensayo múltiple es la molécula empleada como molécula detectora, que en el caso del ELISA fue proteína G marcada con peroxidasa y en el ensayo múltiple fue el anticuerpo 1BH7 específico frente al dominio constante de las IgGs porcinas. Mientras que el uso de proteína G permite desarrollar ensayos independientes de especie, capaces de detectar de forma específica inmunoglobulinas del tipo IgG, esta proteína presenta una afinidad variable en función de la especie, mostrando una menor especificidad por IgGs porcinas [255]. En este caso, la especificidad y respuesta del anticuerpo 1BH7, seleccionado específicamente para este fin, podría ser una mejor estrategia para la detección múltiple de IgGs porcinas. Múltiples estudios han mostrado una elevada seroprevalencia frente a este virus tanto entre cerdos y jabalíes como en humanos, mostrándose una relación muy estrecha entre ambos. La mayor incidencia detectada en humanos se relaciona directamente con un contacto estrecho con el sector porcino, encontrándose las seroprevalencias más elevadas entre trabajadores de este sector, lo que refuerza las hipótesis de los últimos años que indican que los cerdos son un importante reservorio de HEV [269, 270]. La hepatitis E es una importante enfermedad zoonótica que cada vez muestra una expansión mayor en Europa, habiéndose convertido en una enfermedad endémica en el sector porcino a nivel mundial [271, 272]. En el presente estudio, se ha evidenciado una seroprevalencia en cerdos de cría intensiva en Alemania del 38,16 % (382/1.001).

Por lo que se puede concluir, que el ensayo múltiple desarrollado es una potente herramienta para el control epidemiológico de importantes patógenos para la industria en ganado porcino.





# CONCLUSIONES



## VI. Conclusiones

1. Las proteínas recombinantes permiten facilitar y reducir costes del diagnóstico de laboratorio, ya que presentan una funcionalidad comparable a los antígenos nativos y, además, pueden emplearse en la obtención de moléculas de reconocimiento específico (como anticuerpos y aptámeros) para el desarrollo de métodos de diagnóstico.

2. Los aptámeros son unas prometedoras herramientas de aplicación al área diagnóstica que pueden mejorar en determinadas condiciones la sensibilidad de los inmunoensayos, mostrando el potencial de ampliar su implantación. Sin embargo, no ha sido posible reemplazar por completo el papel de los anticuerpos en estos desarrollos.

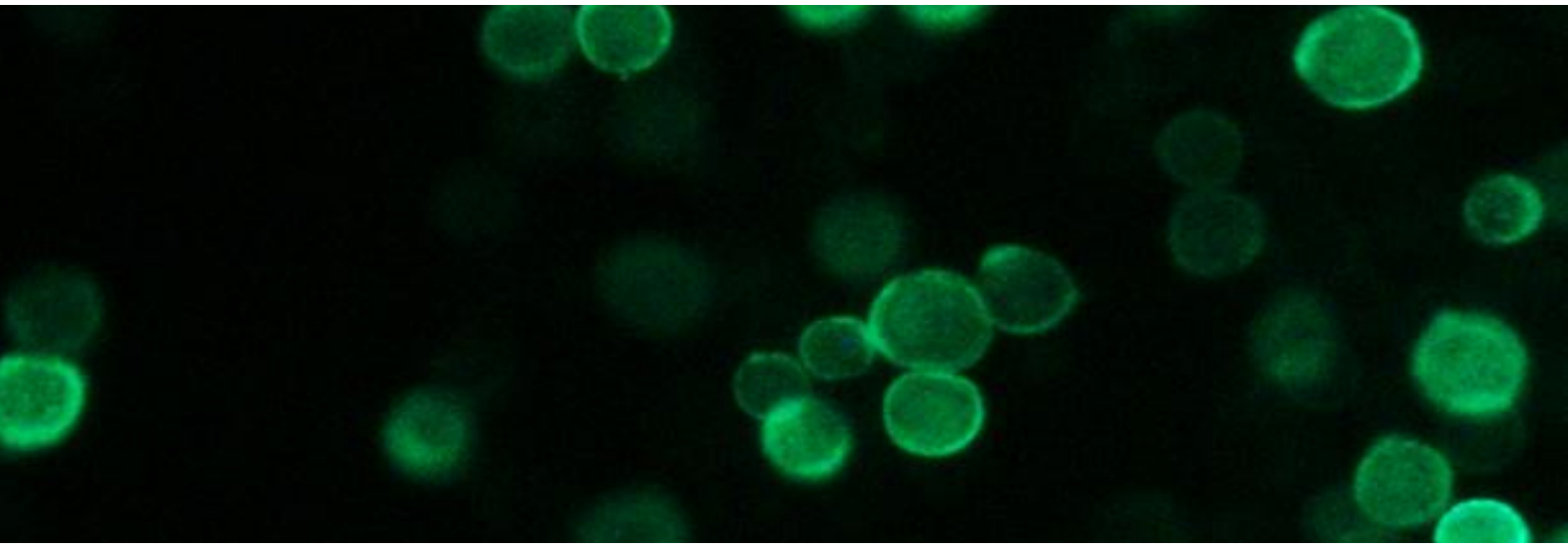
3. La optimización de ensayos ELASA ha mostrado ser altamente dependiente de la matriz empleada como muestra, no permitiendo su adaptación al uso en matrices complejas como las heces. Sin embargo, al emplear como matriz hisopos obtenidos del tracto respiratorio, mostraron una mejora de los parámetros diagnósticos con respecto al ELISA.

4. Empleando un aptámero específico frente a la NP de SIV en combinación con un anticuerpo monoclonal revelador, se ha conseguido optimizar un ensayo ELASA para la detección de antígeno en hisopos nasales con gran interés como producto comercial.

5. En el presente trabajo se han obtenido tres nuevos anticuerpos monoclonales específicos frente a la proteína VP30 con un gran potencial para su aplicación al diagnóstico directo de ASFV.

6. Los ensayos múltiples son una plataforma muy prometedora que podría simplificar la vigilancia epidemiológica, ahorrando tiempo, costes y volumen de muestra. En el presente trabajo se ha desarrollado un panel para la detección de anticuerpos específicos frente a *Mycobacterium bovis*, PRRSV, SIV, HEV, ASFV y CSFV que muestra buenos parámetros para el diagnóstico simultáneo y diferencial de todos los patógenos, mostrando una sensibilidad ligeramente superior al ELISA, especialmente a días tempranos post-infección.





# **BIBLIOGRAFÍA**



## VII. Bibliografía

1. WorldBank. World Bank DataBank. 2020 [citado el 25 de febrero de 2020]; Accesible en línea en: <https://data.worldbank.org>.
2. FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Transforming the livestock sector through the Sustainable Development Goals. 2018, Rome, Italy.
3. FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Food Outlook - Biannual Report on Global Food Markets. Food Outlook. 2020, Rome, Italy.
4. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Gobierno de España. Sectores ganaderos. Porcino. 2020; [citado el 7 de julio de 2020]. Accesible en línea en: <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/sectores-ganaderos/porcino/>.
5. Oficina Estadística de la Unión Europea, E. Pig population - annual data. 2020 2 julio 2020 [citado el 7 de julio de 2020]; Accesible en línea en: [https://appsso.eurostat.ec.europa.eu/nui/show.do?dataset=apro\\_mt\\_lspig&lang=en](https://appsso.eurostat.ec.europa.eu/nui/show.do?dataset=apro_mt_lspig&lang=en).
6. Food and Agriculture Organization of the United Nations, F. FAOSTAT-base de datos forestal. 2018 [citado el 7 de julio de 2020]; Accesible en línea en: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL/visualize>.
7. FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, World agriculture: towards 2015/2030. An FAO perspective. 2003, UK and USA: Earthscan Publications Ltd.
8. FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Livestock production by region. Global Livestock Environmental Assessment Model (GLEAM) 2020 [citado el 23 de diciembre de 2020]; Accesible en línea en: <http://www.fao.org/gleam/results/en>.
9. FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, y OIE, World Organisation for Animal Health, Guía de buenas prácticas ganaderas para la seguridad sanitaria de los alimentos de origen animal. 2009 [citado el 23 de julio de 2020]. Accesible en línea en: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Current\\_Scientific\\_Issues/docs/pdf/esp\\_guide.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Current_Scientific_Issues/docs/pdf/esp_guide.pdf)
10. Chae, C., Porcine respiratory disease complex: Interaction of vaccination and porcine circovirus type 2, porcine reproductive and respiratory syndrome virus, and *Mycoplasma hyopneumoniae*. The Veterinary Journal, 2016. 212: p. 1-6.

## *Bibliografía*

11. VanderWaal, K. and Deen, J. Global trends in infectious diseases of swine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018. 115(45): p. 11495-11500.
12. Standing up to infectious disease. *Nat Microbiol*, 2019. 4(1): p. 1.
13. Dehove, A., et al., Economic analysis and costing of animal health: a literature review of methods and importance. *Rev Sci Tech*, 2012. 31(2): p. 605-17, 591-604.
14. Iriti, M. and Faoro, F., Review of innate and specific immunity in plants and animals. *Mycopathologia*, 2007. 164(2): p. 57-64.
15. Roitt, I., Brostoff, J. and Male, D., *Immunology*. Sixth edition ed. 2001, London: MOSBY, an imprint of Harcourt Publishers Limited.
16. Delves, P.J., et al., *Roitt's Essential Immunology*. 12th Edition ed. Essentials. 2011: Wiley-Blackwell.
17. Schroeder, H.W., Jr. and Cavacini, L., Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol*, 2010. 125(2 Suppl 2): p. S41-52.
18. Absolute antibody. *Antibody Isotypes & Subtypes*. 2020 [citado el 2 de diciembre de 2020]; Accesible en línea en: <https://absoluteantibody.com/antibody-resources/antibody-overview/antibody-isotypes-subtypes/>.
19. Snow, J., Cholera and the Water Supply in the South Districts of London in 1854. *J Public Health Sanit Rev*, 1856. 2(7): p. 239-257.
20. WHO, World Health Organization, WHO | Epidemiology. 2020 [citado el 1 de abril de 2020]; Accesible en línea en: <http://www.who.int/topics/epidemiology/en/>.
21. Miller, W.C., Infectious disease (in) epidemiology. *Epidemiology*, 2010. 21(5): p. 593-4.
22. Riley, L.W. and Blanton, R.E. Advances in Molecular Epidemiology of Infectious Diseases: Definitions, Approaches, and Scope of the Field. *Microbiology spectrum*, 2018. 6(6): p. 10.1128/microbiolspec.AME-0001-2018.
23. Storbjörk, J., One model to rule them all? Governing images in the shadow of the disease model of addiction. *Drug Alcohol Rev*, 2018. 37(6): p. 726-728.
24. Gerner-Smidt, P., et al., Whole Genome Sequencing: Bridging One-Health Surveillance of Foodborne Diseases. *Front Public Health*, 2019. 7: p. 172.
25. Atlas, R.M., One Health: its origins and future. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2013. 365: p. 1-13.

26. WHO, World Health Organization. El enfoque multisectorial de la OMS «Una salud». 2017 [citado el 21 de julio de 2020]; Accesible en línea en: <https://www.who.int/features/qa/one-health/es/>.
27. van der Hoek, L., et al., Host switching pathogens, infectious outbreaks and zoonosis: A Marie Skłodowska-Curie innovative training network (HONOURS). *Virus Res*, 2018. 257: p. 120-124.
28. ONU, Organización de las Naciones Unidas. Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable Development 2015 [citado el 2 de octubre de 2020]; Accesible en línea en: <https://sustainabledevelopment.un.org/post2015/transformingourworld/publication>.
29. Baron, E.J., et al., A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2013 recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM)(a). *Clin Infect Dis*, 2013. 57(4): p. e22-e121.
30. Messacar, K., et al., Implementation of Rapid Molecular Infectious Disease Diagnostics: the Role of Diagnostic and Antimicrobial Stewardship. *J Clin Microbiol*, 2017. 55(3): p. 715-723.
31. Miller, J.M., et al., A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clin Infect Dis*, 2018. 67(6): p. e1-e94.
32. Chandwani, S. and Kaul, A., Molecular techniques in biomedical sciences: a new era in diagnosis of infectious diseases. *Indian J Pediatr*, 1995. 62(1): p. 41-53.
33. Lecuit, M. and Eloit, M., The potential of whole genome NGS for infectious disease diagnosis. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 2015. 15(12): p. 1517-1519.
34. Ghannam, M.G. and Varacallo, M., Biochemistry, Polymerase Chain Reaction (PCR), in *StatPearls* [Internet]. 2020, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
35. OIE, World Organisation for Animal Health, Biotechnology in the diagnosis of infectious diseases, in *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 2019: Publicado en línea. p. 142-157.
36. Waters, D.L. and Shapter, F.M., The polymerase chain reaction (PCR): general methods. *Methods Mol Biol*, 2014. 1099: p. 65-75.
37. Shahi, S., et al., Polymerase chain reaction (PCR)-based methods: Promising molecular tools in dentistry. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018. 117: p. 983-992.

## *Bibliografía*

38. Bridge, J.A., Reverse transcription-polymerase chain reaction molecular testing of cytology specimens: Pre-analytic and analytic factors. *Cancer Cytopathol*, 2017. 125(1): p. 11-19.
39. Spencer, S., et al., Comparison of Respiratory Specimen Collection Methods for Detection of Influenza Virus Infection by Reverse Transcription-PCR: a Literature Review. *J Clin Microbiol*, 2019. 57(9).
40. de Paz, H.D., Brotons, P. and Muñoz-Almagro, C., Molecular isothermal techniques for combating infectious diseases: towards low-cost point-of-care diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn*, 2014. 14(7): p. 827-43.
41. Mayboroda, O., Katakis, I., and O'Sullivan, C.K., Multiplexed isothermal nucleic acid amplification. *Analytical Biochemistry*, 2018. 545: p. 20-30.
42. Yalow, R.S. and Berson, S.A., Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J Clin Invest*, 1960. 39: p. 1157-75.
43. Sakamoto, S., et al., Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *J Nat Med*, 2018. 72(1): p. 32-42.
44. Spencer, K.-A., Osorio, F., and Hiscox, J., Recombinant viral proteins for use in diagnostic ELISAs to detect virus infection. *Vaccine*, 2007. 25: p. 5653-9.
45. Vinayagamurthy, B., et al., Biotechnology in the Production of Recombinant Vaccine or Antigen for Animal Health. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 2006.
46. Cohen, S.N., et al., Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids & In Vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1973. 70(11): p. 3240.
47. Balamurugan, V., et al., Recombinant protein-based viral disease diagnostics in veterinary medicine. *Expert Rev Mol Diagn*, 2010. 10(6): p. 731-53.
48. Gifre, L., et al., Trends in recombinant protein use in animal production. *Microbial cell factories*, 2017. 16(1): p. 40-40.
49. Katzen, F., Gateway(®) recombinational cloning: a biological operating system. *Expert Opin Drug Discov*, 2007. 2(4): p. 571-89.
50. Çelik, E. and Çalık, P., Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnology Advances*, 2012. 30(5): p. 1108-1118.

51. Kaur, J., Kumar, A., and Kaur, J., Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018. 106: p. 803-822.
52. McKenzie, E.A. and Abbott, W.M., Expression of recombinant proteins in insect and mammalian cells. *Methods*, 2018. 147: p. 40-49.
53. Baghban, R., et al., Yeast Expression Systems: Overview and Recent Advances. *Molecular Biotechnology*, 2019. 61(5): p. 365-384.
54. Drugmand, J.C., Schneider, Y.J., and Agathos, S.N., Insect cells as factories for biomanufacturing. *Biotechnology Advances*, 2012. 30(5): p. 1140-1157.
55. van Oers, M.M., Pijlman, G.P., and Vlak, J.M., Thirty years of baculovirus-insect cell protein expression: from dark horse to mainstream technology. *J Gen Virol*, 2015. 96(Pt 1): p. 6-23.
56. Fernández, F.J. and Vega, M.C., Choose a Suitable Expression Host: A Survey of Available Protein Production Platforms. *Adv Exp Med Biol*, 2016. 896: p. 15-24.
57. Yusibov, V., Kushnir, N., and Streatfield, S.J., Antibody Production in Plants and Green Algae. *Annu Rev Plant Biol*, 2016. 67: p. 669-701.
58. Liénard, D., et al., Pharming and transgenic plants. *Biotechnol Annu Rev*, 2007. 13: p. 115-47.
59. Thomas, D.R., et al., Evolution of plant-made pharmaceuticals. *Int J Mol Sci*, 2011. 12(5): p. 3220-36.
60. Aricescu, A.R. and Owens, R.J., Expression of recombinant glycoproteins in mammalian cells: towards an integrative approach to structural biology. *Current Opinion in Structural Biology*, 2013. 23(3): p. 345-356.
61. Zhu, J. and Hatton, D., New Mammalian Expression Systems. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2018. 165: p. 9-50.
62. Dyson, M.R., Fundamentals of Expression in Mammalian Cells. *Adv Exp Med Biol*, 2016. 896: p. 217-24.
63. Hunter, M., et al., Optimization of Protein Expression in Mammalian Cells. *Curr Protoc Protein Sci*, 2019. 95(1): p. e77.
64. Chou, C.P., Engineering cell physiology to enhance recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007. 76(3): p. 521-32.
65. Briand, L., et al., A self-inducible heterologous protein expression system in *Escherichia coli*. *Scientific reports*, 2016. 6: p. 33037-33037.

## *Bibliografía*

66. Guzman, L.M., et al., Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol*, 1995. 177(14): p. 4121-30.
67. Smith, G.E., Summers, M.D., and Fraser, M.J., Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol Cell Biol*, 1983. 3(12): p. 2156-65.
68. Kost, T.A. and Kemp, C.W., *Fundamentals of Baculovirus Expression and Applications*. *Adv Exp Med Biol*, 2016. 896: p. 187-97.
69. Martínez-Solís, M., Herrero, S., and Targovnik, A.M., Engineering of the baculovirus expression system for optimized protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019. 103(1): p. 113-123.
70. Irons, S.L., et al., Protein Production Using the Baculovirus Expression System. *Curr Protoc Protein Sci*, 2018. 91: p. 5.5.1-5.5.22.
71. Kovaleva, E. and D.C. Davis, Protein Production with Recombinant Baculoviruses in Lepidopteran Larvae. *Methods Mol Biol*, 2016. 1350: p. 285-97.
72. O'Connell, K.P., et al., Production of a recombinant antibody fragment in whole insect larvae. *Mol Biotechnol*, 2007. 36(1): p. 44-51.
73. Köhler, G. and Milstein, C., Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur J Immunol*, 1976. 6(7): p. 511-9.
74. Gao, Y., et al., A brief review of monoclonal antibody technology and its representative applications in immunoassays. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 2018. 39(4): p. 351-364.
75. Nelson, P.N., et al., Monoclonal antibodies. *Molecular pathology : MP*, 2000. 53(3): p. 111-117.
76. Hanack, K., Messerschmidt, K., and Listek, M., Antibodies and Selection of Monoclonal Antibodies. *Adv Exp Med Biol*, 2016. 917: p. 11-22.
77. Nowinski, R.C., et al., The isolation of hybrid cell lines producing monoclonal antibodies against the p15(E) protein of ecotropic murine leukemia viruses. *Virology*, 1979. 93(1): p. 111-26.
78. Kumar, R., et al., Phage display antibody libraries: A robust approach for generation of recombinant human monoclonal antibodies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019. 135: p. 907-918.
79. Basu, K., et al., Why recombinant antibodies — benefits and applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 2019. 60: p. 153-158.

80. Wang, Q., et al., Antibody glycoengineering strategies in mammalian cells. *Biotechnol Bioeng*, 2018. 115(6): p. 1378-1393.
81. Tans, R., et al., Affimers as an alternative to antibodies for protein biomarker enrichment. *Protein Expression and Purification*, 2020. 174: p. 105677.
82. Nezlín, R., Aptamers in immunological research. *Immunol Lett*, 2014. 162(2 Pt B): p. 252-5.
83. Chandola, C., et al., Application of aptamers in diagnostics, drug-delivery and imaging. *J Biosci*, 2016. 41(3): p. 535-61.
84. Ilgu, M. and Nilsen-Hamilton, M., Aptamers in analytics. *Analyst*, 2016. 141(5): p. 1551-68.
85. Wu, X., et al., Aptamers: active targeting ligands for cancer diagnosis and therapy. *Theranostics*, 2015. 5(4): p. 322-44.
86. Toh, S.Y., et al., Aptamers as a replacement for antibodies in enzyme-linked immunosorbent assay. *Biosens Bioelectron*, 2015. 64: p. 392-403.
87. Engvall, E. and Perlmann, P., Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 1971. 8(9): p. 871-4.
88. Van Weemen, B.K. and Schuurs, A.H., Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Lett*, 1971. 15(3): p. 232-236.
89. Shah, K. and Maghsoudlou, P., Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. *Br J Hosp Med (Lond)*, 2016. 77(7): p. C98-101.
90. Gan, S.D. and Patel, K.R., Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Invest Dermatol*, 2013. 133(9): p. e12.
91. Singh, R.P., et al., A sandwich-ELISA for the diagnosis of Peste des petits ruminants (PPR) infection in small ruminants using anti-nucleocapsid protein monoclonal antibody. *Arch Virol*, 2004. 149(11): p. 2155-70.
92. Chen, H., et al., Development and evaluation of a DAS-ELISA for rapid detection of Tembusu virus using monoclonal antibodies against the envelope protein. *PLoS One*, 2014. 9(5): p. e96366.
93. Campbell, R.L., Wagner, D.B., and O'Connell, J.P., Solid phase assay with visual readout. 1987: US.
94. May, K., Prior, M.E., and Richards, I., Capillary immunoassay and device therefor comprising mobilizable particulate labelled reagents. 1997: US.

## *Bibliografia*

95. Rosenstein, R.W. and Bloomster, T.G., Solid phase assay employing capillary flow. 1989: US.
96. Kim, H. and Chung, D.R., A new point-of-care test for the diagnosis of infectious diseases based on multiplex lateral flow immunoassays. 2019. 144(8): p. 2460-2466.
97. Koczula, K.M. and Gallotta, A., Lateral flow assays. *Essays Biochem*, 2016. 60(1): p. 111-20.
98. Magaki, S., et al., An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. *Methods Mol Biol*, 2019. 1897: p. 289-298.
99. Haines, D.M. and West, K.H., Immunohistochemistry: Forging the links between immunology and pathology. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2005. 108(1): p. 151-156.
100. Donaldson, J.G., Immunofluorescence staining. *Curr Protoc Cell Biol*, 2001. Chapter 4: p. Unit 4.3.
101. Ghanadan, A., et al., Clinical aspects of indirect immunofluorescence for autoimmune diseases. *Expert Rev Clin Immunol*, 2015. 11(5): p. 597-616.
102. Toh, S.Y., et al., Aptamers as a replacement for antibodies in enzyme-linked immunosorbent assay. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015. 64: p. 392-403.
103. Li, H.-Y., et al., Advances in detection of infectious agents by aptamer-based technologies. *Emerging microbes & infections*, 2020. 9(1): p. 1671-1681.
104. Kaur, H., et al., Defining Target Product Profiles (TPPs) for Aptamer-Based Diagnostics. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2020. 174: p. 195-209.
105. Park, K.S., Nucleic acid aptamer-based methods for diagnosis of infections. *Biosensors and Bioelectronics*, 2018. 102: p. 179-188.
106. Ferreira, C.S., et al., DNA aptamers against the MUC1 tumour marker: design of aptamer-antibody sandwich ELISA for the early diagnosis of epithelial tumours. *Anal Bioanal Chem*, 2008. 390(4): p. 1039-50.
107. Lee, K.H. and Zeng, H., Aptamer-Based ELISA Assay for Highly Specific and Sensitive Detection of Zika NS1 Protein. *Anal Chem*, 2017. 89(23): p. 12743-12748.
108. Lavania, S., et al., Aptamer-Based TB Antigen Tests for the Rapid Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis: Potential Utility in Screening for Tuberculosis. *ACS Infect Dis*, 2018. 4(12): p. 1718-1726.
109. Vidic, J., et al., Advanced biosensors for detection of pathogens related to livestock and poultry. *Vet Res*, 2017. 48(1): p. 11.

110. Elshal, M.F. and McCoy, J.P., Multiplex bead array assays: performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA. *Methods* (San Diego, Calif.), 2006. 38(4): p. 317-323.
111. Ling, M.M., Ricks, C., and Lea, P., Multiplexing molecular diagnostics and immunoassays using emerging microarray technologies. *Expert Rev Mol Diagn*, 2007. 7(1): p. 87-98.
112. Schena, M., et al., Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 1995. 270(5235): p. 467-70.
113. MacBeath, G., Protein microarrays and proteomics. *Nature Genetics*, 2002. 32(4): p. 526-532.
114. Bryant, P.A., et al., Chips with everything: DNA microarrays in infectious diseases. *Lancet Infect Dis*, 2004. 4(2): p. 100-11.
115. Natesan, M. and Ulrich, R.G., Protein microarrays and biomarkers of infectious disease. *Int J Mol Sci*, 2010. 11(12): p. 5165-83.
116. Tighe, P.J., et al., ELISA in the multiplex era: potentials and pitfalls. *Proteomics Clin Appl*, 2015. 9(3-4): p. 406-22.
117. Vafajoo, A., et al., Multiplexed microarrays based on optically encoded microbeads. *Biomed Microdevices*, 2018. 20(3): p. 66.
118. Aira, C., et al., 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: p. 306.
119. Christopher-Hennings, J., et al., Opportunities for bead-based multiplex assays in veterinary diagnostic laboratories. *J Vet Diagn Invest*, 2013. 25(6): p. 671-91.
120. Boonham, N., et al., Methods in virus diagnostics: From ELISA to next generation sequencing. *Virus Research*, 2014. 186: p. 20-31.
121. Miller, M.B. and Tang, Y.W., Basic Concepts of Microarrays and Potential Applications in Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 2009. 22(4): p. 611-633.
122. Ding, G., et al., Development of a multiplex RT-PCR for the detection of major diarrhoeal viruses in pig herds in China. *Transbound Emerg Dis*, 2020. 67(2): p. 678-685.
123. Salem, A.N.B., et al., Multiplex nested RT-PCR for the detection of porcine enteric viruses. *Journal of Virological Methods*, 2010. 165(2): p. 283-293.

## *Bibliografía*

124. Song, D. and Park, B., Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. *Virus Genes*, 2012. 44(2): p. 167-75.
125. Vlasova, A.N., Amimo, J.O., and Saif, L.J., Porcine Rotaviruses: Epidemiology, Immune Responses and Control Strategies. *Viruses*, 2017. 9(3).
126. Wenske, O., et al., Epidemiological analysis of porcine rotavirus A genotypes in Germany. *Veterinary Microbiology*, 2018. 214: p. 93-98.
127. CDC, Center for Disease Control and Prevention. Rotavirus. Public Health Image Library (PHIL) 1978 [citado el 2 de octubre de 2020]; Accesible en línea en: <https://phil.cdc.gov/details.aspx?pid=197>.
128. Ruiz, M., et al., Molecular Biology of Rotavirus Entry and Replication. *TheScientificWorldJournal*, 2009. 9: p. 1476-97.
129. Zhu, J., et al., Development of porcine rotavirus vp6 protein based ELISA for differentiation of this virus and other viruses. *Virology*, 2013. 453(1): p. 91.
130. Cheong, Y., et al., Survey of porcine respiratory disease complex-associated pathogens among commercial pig farms in Korea via oral fluid method. *Journal of veterinary science*, 2017. 18(3): p. 283-289.
131. Opriessnig, T., Gimenez-Lirola, L.G., and Halbur, P.G., Polymicrobial respiratory disease in pigs. *Anim Health Res Rev*, 2011. 12(2): p. 133-48.
132. Ticó, G., Segalés, J., and Martínez, J., The blurred border between porcine circovirus type 2-systemic disease and porcine respiratory disease complex. *Veterinary Microbiology*, 2013. 163(3): p. 242-247.
133. Thacker, E.L., Immunology of the Porcine Respiratory Disease Complex. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 2001. 17(3): p. 551-565.
134. Hernandez-Garcia, J., et al., The use of oral fluids to monitor key pathogens in porcine respiratory disease complex. *Porcine health management*, 2017. 3: p. 7-7.
135. Qin, S., et al., Viral communities associated with porcine respiratory disease complex in intensive commercial farms in Sichuan province, China. *Scientific reports*, 2018. 8(1): p. 13341-13341.
136. Van Reeth, K., Avian and swine influenza viruses: our current understanding of the zoonotic risk. *Vet Res*, 2007. 38(2): p. 243-60.
137. Wikramaratna, P.S. and Gupta, S., Influenza outbreaks. *Cell Microbiol*, 2009. 11(7): p. 1016-24.

138. Crisci, E., et al., Review: Influenza virus in pigs. *Molecular Immunology*, 2013. 55(3): p. 200-211.
139. Dadonaite, B., et al., Filamentous influenza viruses. *J Gen Virol*, 2016. 97(8): p. 1755-1764.
140. Choppin, P.W., Murphy, J.S., and Tamm, I., Studies of two kinds of virus particles which comprise influenza A2 virus strains. III. Morphological characteristics: independence to morphological and functional traits. *J Exp Med*, 1960. 112(5): p. 945-52.
141. York, I.A., Stevens, J., and Alymova, I.V., Influenza virus N-linked glycosylation and innate immunity. *Biosci Rep*, 2019. 39(1).
142. Su, S., et al., Novel Influenza D virus: Epidemiology, pathology, evolution and biological characteristics. *Virulence*, 2017. 8(8): p. 1580-1591.
143. Kim, W.I., et al., Characterization of the humoral immune response of experimentally infected and vaccinated pigs to swine influenza viral proteins. *Arch Virol*, 2006. 151(1): p. 23-36.
144. Kuntz-Simon, G. and Madec, F., Genetic and antigenic evolution of swine influenza viruses in Europe and evaluation of their zoonotic potential. *Zoonoses Public Health*, 2009. 56(6-7): p. 310-25.
145. Haach, V., et al., Evaluation of two multiplex RT-PCR assays for detection and subtype differentiation of Brazilian swine influenza viruses. *Braz J Microbiol*, 2020. 51(3): p. 1447-1451.
146. Maes, D., et al., Update on *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs: Knowledge gaps for improved disease control. *Transbound Emerg Dis*, 2018. 65 Suppl 1: p. 110-124.
147. Razin, S., Yogev, D., and Naot, Y., Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 1998. 62(4): p. 1094-1156.
148. Cheikh Saad Bouh, K., Shareck, F., and Dea, S., Monoclonal antibodies to *Escherichia coli*-expressed P46 and P65 membranous proteins for specific immunodetection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in lungs of infected pigs. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2003. 10(3): p. 459-68.
149. Feng, Z.-X., et al., Use of serological and mucosal immune responses to *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens P97R1, P46 and P36 in the diagnosis of infection. *The Veterinary Journal*, 2014. 202(1): p. 128-133.

## *Bibliografia*

150. Ouyang, T., et al., Co-Infection of Swine with Porcine Circovirus Type 2 and Other Swine Viruses. *Viruses*, 2019. 11(2): p. 185.
151. Kekarainen, T. and Segalés, J. Porcine circovirus 2 immunology and viral evolution. *Porcine health management*, 2015. 1: p. 17.
152. Tribble, B.R. and Rowland, R.R., Genetic variation of porcine circovirus type 2 (PCV2) and its relevance to vaccination, pathogenesis and diagnosis. *Virus Research*, 2012. 164(1): p. 68-77.
153. Zhang, H.H., et al., Novel circovirus species identified in farmed pigs designated as Porcine circovirus 4, Hunan province, China. *Transbound Emerg Dis*, 2020. 67(3): p. 1057-1061.
154. Meng, X. J., Porcine Circovirus Type 2 (PCV2): Pathogenesis and Interaction with the Immune System. *Annual Review of Animal Biosciences*, 2013. 1(1): p. 43-64.
155. Opriessnig, T., et al., A Porcine circovirus type 2b (PCV2b)-based experimental vaccine is effective in the PCV2b-*Mycoplasma hyopneumoniae* coinfection pig model. *Vaccine*, 2019. 37(44): p. 6688-6695.
156. Lunney, J.K., et al., Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV): Pathogenesis and Interaction with the Immune System. *Annual Review of Animal Biosciences*, 2016. 4(1): p. 129-154.
157. Kvisgaard, L.K., Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV). 2013, Technical University of Denmark.
158. Dong, J., et al., Hypermutations in porcine respiratory and reproductive syndrome virus. *Canadian journal of veterinary research, Revue canadienne de recherche veterinaire*, 2019. 83(2): p. 104-109.
159. Dea, S., et al., Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. *Arch Virol*, 2000. 145(4): p. 659-88.
160. Wootton, S.K., Nelson, E.A., and Yoo, D., Antigenic structure of the nucleocapsid protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 1998. 5(6): p. 773-779.
161. Meulenbergh, J.J.M., et al., Localization and Fine Mapping of Antigenic Sites on the Nucleocapsid Protein N of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus with Monoclonal Antibodies. *Virology*, 1998. 252(1): p. 106-114.

162. Zhang, G., et al., Identification of the B-cell epitopes on N protein of type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus, using monoclonal antibodies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019. 130: p. 300-306.
163. Sanchez-Vizcaino, J.M., et al., An update on the epidemiology and pathology of African swine fever. *J Comp Pathol*, 2015. 152(1): p. 9-21.
164. Blome, S., Gabriel, C., and Beer, M., Pathogenesis of African swine fever in domestic pigs and European wild boar. *Virus Res*, 2013. 173(1): p. 122-30.
165. Gallardo, M.C., et al., African swine fever: a global view of the current challenge. *Porcine Health Manag*, 2015. 1: p. 21.
166. Eustace Montgomery, R., On A Form of Swine Fever Occurring in British East Africa (Kenya Colony). *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, 1921. 34: p. 159-191.
167. Arias, M. and Sánchez-Vizcaíno, J.M., African swine fever Eradication: The Spanish model, in *Trends in Emerging Viral Infections of Swine*. 2002, Iowa State University Press. p. 133-139.
168. Sánchez-Vizcaíno, J.M., et al., Scientific Review on African Swine Fever. 2009, EFSA. p. 1-141.
169. Gaudreault, N.N., et al., African Swine Fever Virus: An Emerging DNA Arbovirus. *Front Vet Sci*, 2020. 7: p. 215.
170. World Organisation for Animal Health, O. World Animal Health Information System (WAHIS Interface). 2019 [citado el 16 de abril de 2019]; Accesible en línea en: [http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseaseoutbreakmaps](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseaseoutbreakmaps).
171. Gallardo, C., 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(8): p. 2555-65.
172. Sauter-Louis, C., et al., Joining the club: First detection of African swine fever in wild boar in Germany. *Transbound Emerg Dis*, 2020. doi: 10.1111/tbed.13890
173. Dixon, L.K., Sun, H., and Roberts, H., African swine fever. *Antiviral Res*, 2019. 165: p. 34-41.
174. Dixon, L.K., et al., African swine fever virus replication and genomics. *Virus Res*, 2013. 173(1): p. 3-14.

## *Bibliografía*

175. Alejo, A., et al., A Proteomic Atlas of the African Swine Fever Virus Particle. *J Virol*, 2018. 92(23).
176. Andrés, G., et al., African Swine Fever Virus Polyproteins pp220 and pp62 Assemble into the Core Shell. *Journal of virology*, 2003. 76: p. 12473-82.
177. Cubillos, C., et al., African swine fever virus serodiagnosis: a general review with a focus on the analyses of African serum samples. *Virus Res*, 2013. 173(1): p. 159-67.
178. Freitas, T. and Lyra, T., Molecular studies on African swine fever virus from Brazilian isolates. *Arquivos do Instituto Biológico*, 2018. 85. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000712016>
179. Gimenez-Lirola, L.G., et al., Detection of African Swine Fever Virus Antibodies in Serum and Oral Fluid Specimens Using a Recombinant Protein 30 (p30) Dual Matrix Indirect ELISA. *PLoS One*, 2016. 11(9): p. e0161230.
180. Blome, S., et al., Classical Swine Fever-An Updated Review. *Viruses*, 2017. 9(4).
181. Schulz, K., Staubach, C., and Blome, S., African and classical swine fever: similarities, differences and epidemiological consequences. *Vet Res*, 2017. 48(1): p. 84.
182. Hanson, R.P., Origin of hog cholera. *J Am Vet Med Assoc*, 1957. 131(5): p. 211-8.
183. Edwards, S., et al., Classical swine fever: the global situation. *Vet Microbiol*, 2000. 73(2-3): p. 103-19.
184. Paton, D.J. and Greiser-Wilke, I., Classical swine fever--an update. *Res Vet Sci*, 2003. 75(3): p. 169-78.
185. Beer, M., et al., Genetic variability and distribution of Classical swine fever virus. *Anim Health Res Rev*, 2015. 16(1): p. 33-9.
186. König, M., et al., Classical swine fever virus: independent induction of protective immunity by two structural glycoproteins. *J Virol*, 1995. 69(10): p. 6479-86.
187. Beer, M., et al., Novel marker vaccines against classical swine fever. *Vaccine*, 2007. 25(30): p. 5665-5670.
188. Chen, S., et al., Expression and characterization of a recombinant porcized antibody against the E2 protein of classical swine fever virus. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018. 102(2): p. 961-970.
189. Ridpath, J.F., BVDV genotypes and biotypes: practical implications for diagnosis and control. *Biologicals*, 2003. 31(2): p. 127-31.

190. Haines, F.J., et al., Development and validation of a multiplex, real-time RT PCR assay for the simultaneous detection of classical and African swine fever viruses. *PLoS One*, 2013. 8(7): p. e71019.
191. Agüero, M., et al., A highly sensitive and specific gel-based multiplex RT-PCR assay for the simultaneous and differential diagnosis of African swine fever and Classical swine fever in clinical samples. *Vet Res*, 2004. 35(5): p. 551-63.
192. Sastre, P., 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(5): p. 543-9.
193. Cano-Terriza, D., et al., Epidemiological surveillance of *Mycobacterium tuberculosis* complex in extensively raised pigs in the south of Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, 2018. 159: p. 87-91.
194. Barandiaran, S., et al., Tuberculosis in swine co-infected with *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* and *Mycobacterium bovis* in a cluster from Argentina. *Epidemiology and Infection*, 2015. 143(5): p. 966-974.
195. Bailey, S.S., et al., *Mycobacterium bovis* infection in domestic pigs in Great Britain. *Vet J*, 2013. 198(2): p. 391-7.
196. Pesciaroli, M., et al., Tuberculosis in domestic animal species. *Research in Veterinary Science*, 2014. 97: p. S78-S85.
197. Cousins, D.V., *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. *Rev Sci Tech*, 2001. 20(1): p. 71-85.
198. OIE, World Organisation for Animal Health, Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2019. 2019 [citado el 27 de julio de 2020]; Accesible en línea de: <https://www.oie.int/en/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>.
199. Bolin, C.A., et al., Infection of swine with *Mycobacterium bovis* as a model of human tuberculosis. *J Infect Dis*, 1997. 176(6): p. 1559-66.
200. Cardoso-Toset, F., et al., Evaluation of five serologic assays for bovine tuberculosis surveillance in domestic free-range pigs from southern Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, 2017. 137: p. 101-104.
201. Infantes-Lorenzo, J.A., et al., Specificity of serological test for detection of tuberculosis in cattle, goats, sheep and pigs under different epidemiological situations. *BMC Vet Res*, 2019. 15(1): p. 70.
202. Lyashchenko, K.P., et al., Animal-side serologic assay for rapid detection of *Mycobacterium bovis* infection in multiple species of free-ranging wildlife. *Veterinary Microbiology*, 2008. 132(3): p. 283-292.

## Bibliografía

203. Nimgaonkar, I., et al., Hepatitis E virus: advances and challenges. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2018. 15(2): p. 96-110.
204. Wang, Y., et al., Hepatitis E Virus. *Adv Exp Med Biol*, 2016. 948: p. 1-16.
205. Lhomme, S., et al., Hepatitis E Pathogenesis. *Viruses*, 2016. 8(8): p. 212.
206. Sooryanarain, H. and Meng, X.J., Swine hepatitis E virus: Cross-species infection, pork safety and chronic infection. *Virus Research*, 2020. 284: p. 197985.
207. WHO, World Health Organization, Hepatitis E. 2019 [citado el 27 de julio de 2020]; Accesible en línea en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-e>.
208. Meng, X.J., et al., A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997. 94: p. 9860-5.
209. Kenney, S.P., The Current Host Range of Hepatitis E Viruses. *Viruses*, 2019. 11(5).
210. Nagashima, S., et al., Characterization of the Quasi-Enveloped Hepatitis E Virus Particles Released by the Cellular Exosomal Pathway. 2017. 91(22).
211. Nan, Y., et al., Vaccine Development against Zoonotic Hepatitis E Virus: Open Questions and Remaining Challenges. *Frontiers in Microbiology*, 2018. 9(266).
212. Mrzljak, A., et al., Epidemiology of hepatitis E in South-East Europe in the "One Health" concept. *World J Gastroenterol*, 2019. 25(25): p. 3168-3182.
213. Green, M.R. and Sambrook, J., *Molecular cloning: a laboratory manual*. Fourth edition. 2012, Nueva York, MA, EE.UU. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
214. Sanchez-Cordon, P.J., et al., Evaluation of protection induced by immunisation of domestic pigs with deletion mutant African swine fever virus Benin $\Delta$ MGF by different doses and routes. *Vaccine*, 2018. 36(5): p. 707-715.
215. Fresco-Taboada, A., et al., A lateral flow assay for the rapid diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in wild boar. *Transbound Emerg Dis*, 2019. 66(5): p. 2175-2179.
216. Hurtado, A., et al., Identification of domains in canine parvovirus VP2 essential for the assembly of virus-like particles. *J Virol*, 1996. 70(8): p. 5422-9.
217. Jarvis, D.L., Chapter 14 Baculovirus–Insect Cell Expression Systems, In: *Methods in Enzymology*, Burgess R.R., and Deutscher, M.P. Editors. 2009, Academic Press. p. 191-222.

218. Hermanson, G.T., Chapter 14 - Microparticles and Nanoparticles. In: Bioconjugate Techniques. 3rd Edition ed. Bioconjugated Techniques. 2013, San Diego, CA, EE.UU.: Academic press.
219. Dean, A.G., Sullivan, K.M., and Soe, M.M., OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health. 2013 6th April 2013 [citado el 209 de diciembre de 2020]; Accesible en línea en: [www.OpenEpi.com](http://www.OpenEpi.com).
220. Sibila, M., et al., Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of Mycoplasma hyopneumoniae infection. Veterinary journal (London, England : 1997), 2009. 181(3): p. 221-231.
221. Lee, J., et al., Comparison of Pathogenicity and Transmissibility of Influenza B and D Viruses in Pigs. Viruses, 2019. 11(10): p. 905.
222. Detmer, S., et al., Diagnostics and surveillance for Swine influenza. Curr Top Microbiol Immunol, 2013. 370: p. 85-112.
223. Chow, E.J., Doyle, J.D., and Uyeki, T.M., Influenza virus-related critical illness: prevention, diagnosis, treatment. Critical care (London, England), 2019. 23(1): p. 214-214.
224. Segalés, J., Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. Virus Research, 2012. 164(1): p. 10-19.
225. Allan, G.M. and Ellis, J.A., Porcine circoviruses: a review. J Vet Diagn Invest, 2000. 12(1): p. 3-14.
226. Dhabaria, A., et al., A High-Efficiency Cellular Extraction System for Biological Proteomics. J Proteome Res, 2015. 14(8): p. 3403-8.
227. Li, X., et al., Development and preliminary application of an immunochromatographic strip for rapid detection of infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine. Journal of Virological Methods, 2011. 176(1): p. 46-52.
228. Cardoso-Toset, F., et al., Evaluation of five serologic assays for bovine tuberculosis surveillance in domestic free-range pigs from southern Spain. Prev Vet Med, 2017. 137(Pt A): p. 101-104.
229. Rodriguez, M.J., et al., Epitope mapping of the nucleocapsid protein of European and North American isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J Gen Virol, 1997. 78 ( Pt 9): p. 2269-78.
230. Shepherd, F., et al., Reoviruses (Rotaviruses and Reoviruses). 2019. p. 715-727.

## *Bibliografía*

231. Ward, R.L. and McNeal, M.M., VP6: A Candidate Rotavirus Vaccine. *The Journal of Infectious Diseases*, 2010. 202(Supplement\_1): p. S101-S107.
232. Lepault, J., et al., Structural polymorphism of the major capsid protein of rotavirus. *Embo j*, 2001. 20(7): p. 1498-507.
233. Mena, J.A., Ramírez, O.T., and Palomares, L.A., Intracellular distribution of rotavirus structural proteins and virus-like particles expressed in the insect cell-baculovirus system. *Journal of Biotechnology*, 2006. 122(4): p. 443-452.
234. Singh, A., et al., Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microb Cell Fact*, 2015. 14: p. 41.
235. Ghosh, S. and Dey, J., Interaction of sodium N-lauroylsarcosinate with N-alkylpyridinium chloride surfactants: Spontaneous formation of pH-responsive, stable vesicles in aqueous mixtures. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2011. 358(1): p. 208-216.
236. Young, C.L., Britton, Z.T., and Robinson, A.S., Recombinant protein expression and purification: a comprehensive review of affinity tags and microbial applications. *Biotechnol J*, 2012. 7(5): p. 620-34.
237. Pastor, A.R., et al., The assembly conformation of rotavirus VP6 determines its protective efficacy against rotavirus challenge in mice. *Vaccine*, 2014. 32(24): p. 2874-2877.
238. Cornaglia, E., Elazhary, Y., and Talbot, B., Characterization of bovine rotavirus VP6 and VP7 as glycoproteins using monoclonal antibodies. *FEMS Microbiol Lett*, 1991. 63(2-3): p. 147-51.
239. Chattopadhyay, S., et al., Computational identification of post-translational modification sites and functional families reveal possible moonlighting role of rotaviral proteins. *Bioinformatics*, 2010. 4(10): p. 448-451.
240. Oikarinen, S., et al., PCR inhibition in stool samples in relation to age of infants. *Journal of Clinical Virology*, 2009. 44(3): p. 211-214.
241. Arnal Bernal, J.L. and Chacón Pérez, G., Sampling for the detection of agents of the porcine respiratory disease complex: Bronchoalveolar lavage or bronchial scraping? *Pig health*, 2017.
242. Baskerville, A., Diagnostic methods in infectious respiratory disease. *N Z Vet J*, 1981. 29(12): p. 239-41.
243. Sosa Portugal, S., et al., Diversity of influenza A viruses retrieved from respiratory disease outbreaks and subclinically infected herds in Spain (2017-2019). *Transbound Emerg Dis*, 2020. doi: 10.1111/tbed.13709.

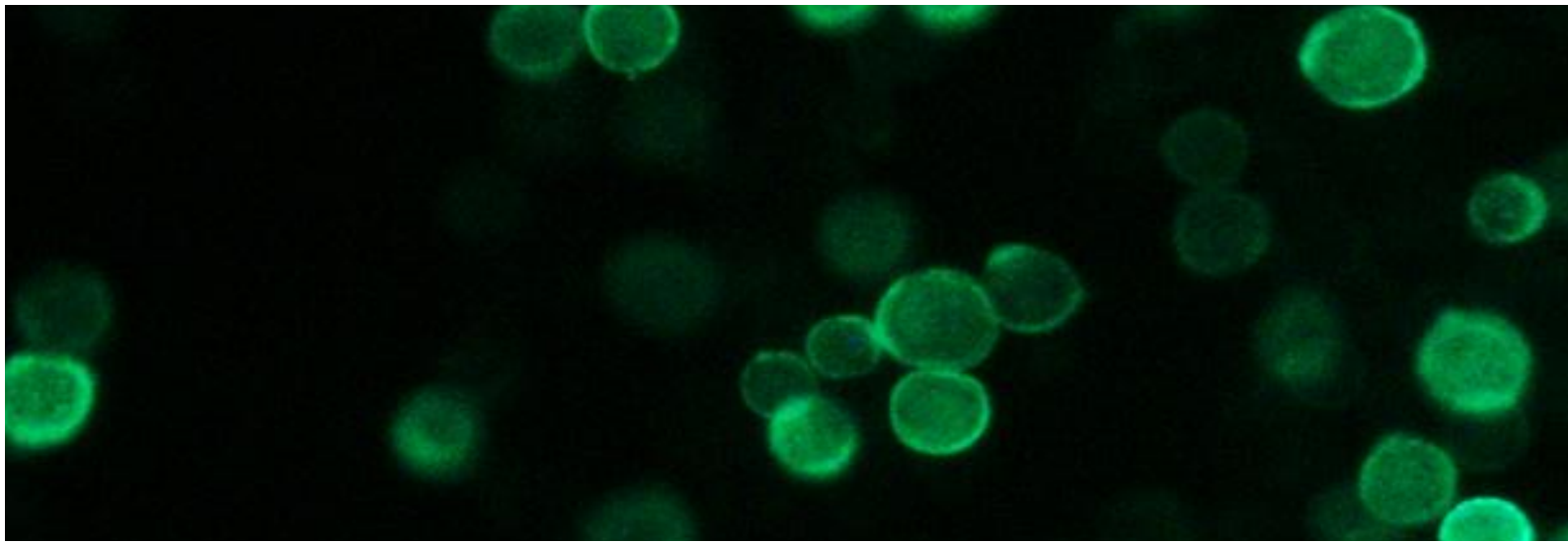
244. Roxo, C., Kotkowiak, W., and Pasternak, A., G-Quadruplex-Forming Aptamers- Characteristics, Applications, and Perspectives. *Molecules* (Basel, Switzerland), 2019. 24(20): p. 3781.
245. Yang, D., G-Quadruplex DNA and RNA. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 2019. 2035: p. 1-24.
246. Platella, C., et al., G-quadruplex-based aptamers against protein targets in therapy and diagnostics. *Biochimica et biophysica acta. General subjects*, 2017. 1861(5 Pt B): p. 1429-1447.
247. Thurmond, M.C., Conceptual foundations for infectious disease surveillance. *J Vet Diagn Invest*, 2003. 15(6): p. 501-14.
248. Yang, S. and Rothman, R.E., PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *The Lancet. Infectious diseases*, 2004. 4(6): p. 337-348.
249. Moiso, N., et al., Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nasal and laryngeal swab specimens in endemically infected pig herds. *Veterinary Record*, 2020. 186(1): p. 27.
250. Guasch, A., et al., Structure of P46, an immunodominant surface protein from *Mycoplasma hyopneumoniae*: interaction with a monoclonal antibody. *Acta Crystallogr D Struct Biol*, 2020. 76(Pt 5): p. 418-427.
251. Mo, X., et al., Structural roles of PCV2 capsid protein N-terminus in PCV2 particle assembly and identification of PCV2 type-specific neutralizing epitope. *PLoS pathogens*, 2019. 15(3): p. e1007562-e1007562.
252. Ahmad, I., et al., Overcoming challenges for amplified expression of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 2018. 144: p. 12-18.
253. OIE, World Organisation for Animal Health. Global Situation of ASF. 2020; Accesible en línea en: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal\\_Health\\_in\\_the\\_World/docs/pdf/Disease\\_cards/ASF/Report\\_47\\_Global\\_situation\\_ASF.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/ASF/Report_47_Global_situation_ASF.pdf).
254. Nieto-Pelegrín, E., Rivera-Arroyo, B., and Sánchez-Vizcaíno, J.M., First Detection of Antibodies Against African Swine Fever Virus in Faeces Samples. *Transbound Emerg Dis*, 2015. 62(6): p. 594-602.
255. Greenfield, E.A. (Ed.), *Antibodies : a laboratory manual*. 2014. Nueva York, EE.UU. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

## *Bibliografía*

256. Alegria-Schaffer, A., Lodge, A., and Vatter, K., Performing and optimizing Western blots with an emphasis on chemiluminescent detection. *Methods Enzymol*, 2009. 463: p. 573-99.
257. Kazakova, A.S., et al., Recombinant Protein p30 for Serological Diagnosis of African Swine Fever by Immunoblotting Assay. *Transbound Emerg Dis*, 2017. 64(5): p. 1479-1492.
258. Teklue, T., et al., Current status and evolving approaches to African swine fever vaccine development. *Transbound Emerg Dis*, 2020. 67(2): p. 529-542.
259. Blome, S., et al., Classical Swine Fever-An Updated Review. *Viruses*, 2017. 9(4): p. 86.
260. Hardstaff, J.L., et al., Evaluating the tuberculosis hazard posed to cattle from wildlife across Europe. *Res Vet Sci*, 2014. 97 Suppl: p. S86-93.
261. Pesciaroli, M., et al., Tuberculosis in domestic animal species. *Res Vet Sci*, 2014. 97 Suppl: p. S78-85.
262. Yang, J., et al., Serum autoantibody against glutathione S-transferase in patients with glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001. 42(6): p. 1273-6.
263. Liu, J., et al., Cloning, expression, and characterization of TonB2 from *Actinobacillus pleuropneumoniae* and potential use as an antigenic vaccine candidate and diagnostic marker. *Can J Vet Res*, 2011. 75(3): p. 183-90.
264. Rahn, J., et al., Vaccines against influenza A viruses in poultry and swine: Status and future developments. *Vaccine*, 2015. 33(21): p. 2414-2424.
265. OIE, World Organisation for Animal Health SWINE INFLUENZA Technical disease cards 2009 June 2009 [citado el 27 de julio de 2020]; Accesible en línea en: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal\\_Health\\_in\\_the\\_World/docs/pdf/Disease\\_cards/SWINE\\_INFLUENZA.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/SWINE_INFLUENZA.pdf).
266. OIE, World Organisation for Animal Health. Chapter 3.8.7. Influenza A virus of swine. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2019* [citado el 3 de noviembre de 2020]; Accesible en línea en: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.08.07\\_INF\\_A\\_SWINE.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.08.07_INF_A_SWINE.pdf).
267. porciNews. Subtipos de la influenza porcina y expectativas de la protección vacunal. 2016 [citado el 22 de noviembre de 2020]; Accesible en línea en: <https://porcino.info/download/influenza-porcina.pdf>.
268. Denner, J., Hepatitis E virus (HEV)-The Future. *Viruses*, 2019. 11(3): p. 251.

269. Krumbholz, A., et al., Seroprevalence of hepatitis E virus (HEV) in humans living in high pig density areas of Germany. *Med Microbiol Immunol*, 2014. 203(4): p. 273-82.
270. Mughini-Gras, L., et al., Hepatitis E virus infection in North Italy: high seroprevalence in swine herds and increased risk for swine workers. *Epidemiol Infect*, 2017. 145(16): p. 3375-3384.
271. Mrzljak, A., et al., Epidemiology of hepatitis E in South-East Europe in the "One Health" concept. *World journal of gastroenterology*, 2019. 25(25): p. 3168-3182.
272. Lange, H., et al., Hepatitis E in Norway: seroprevalence in humans and swine. *Epidemiol Infect*, 2017. 145(1): p. 181-186.



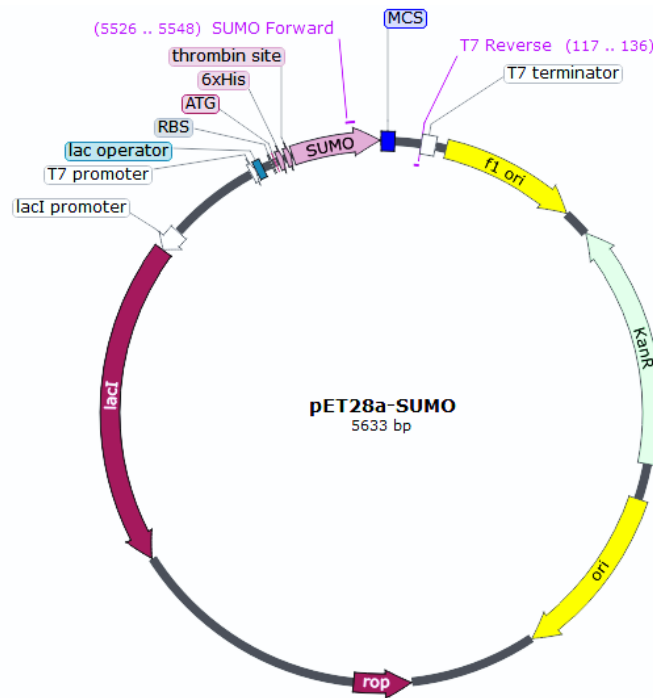


# **ANEXOS**

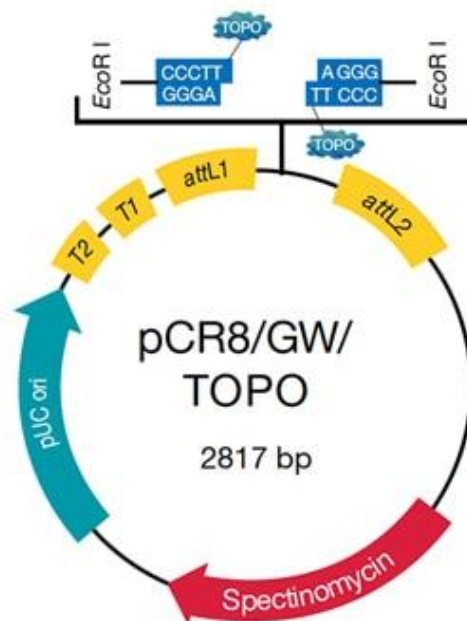


# Anexo I. Mapas de los plásmidos empleados

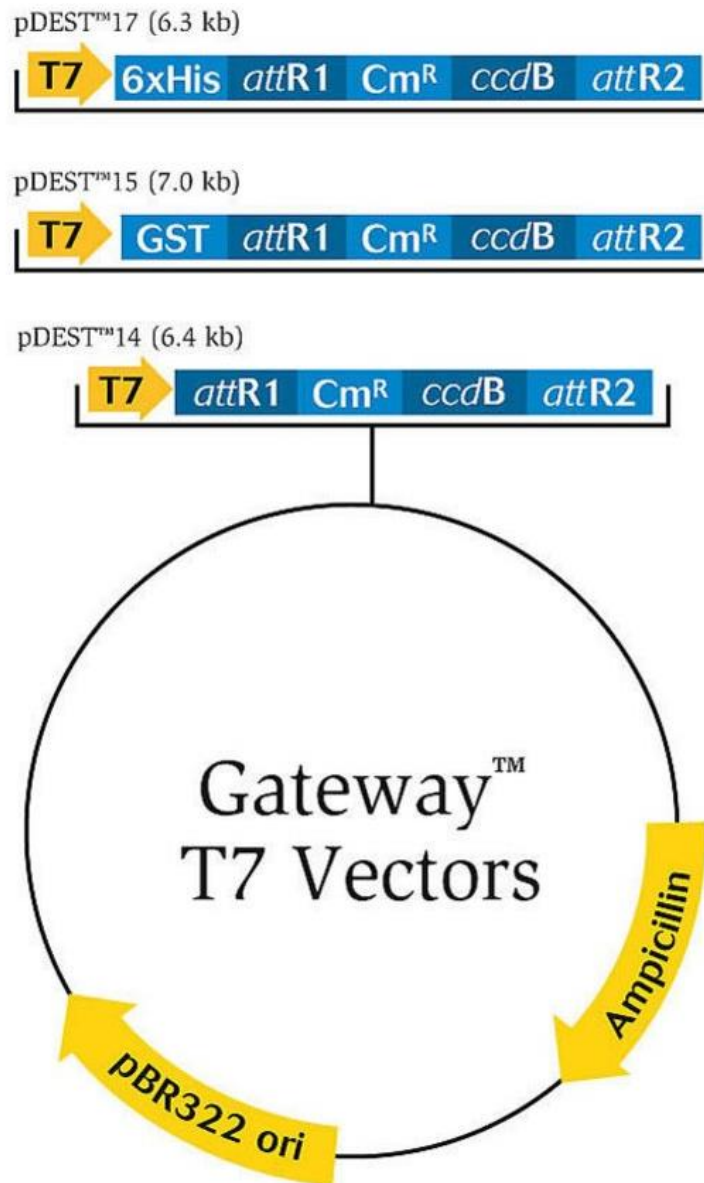
## pET28a-SUMO



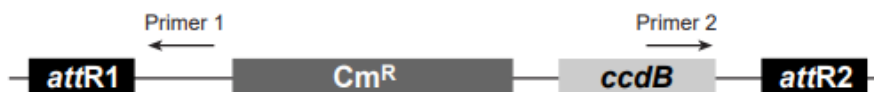
## pCR8/GW/TOPO



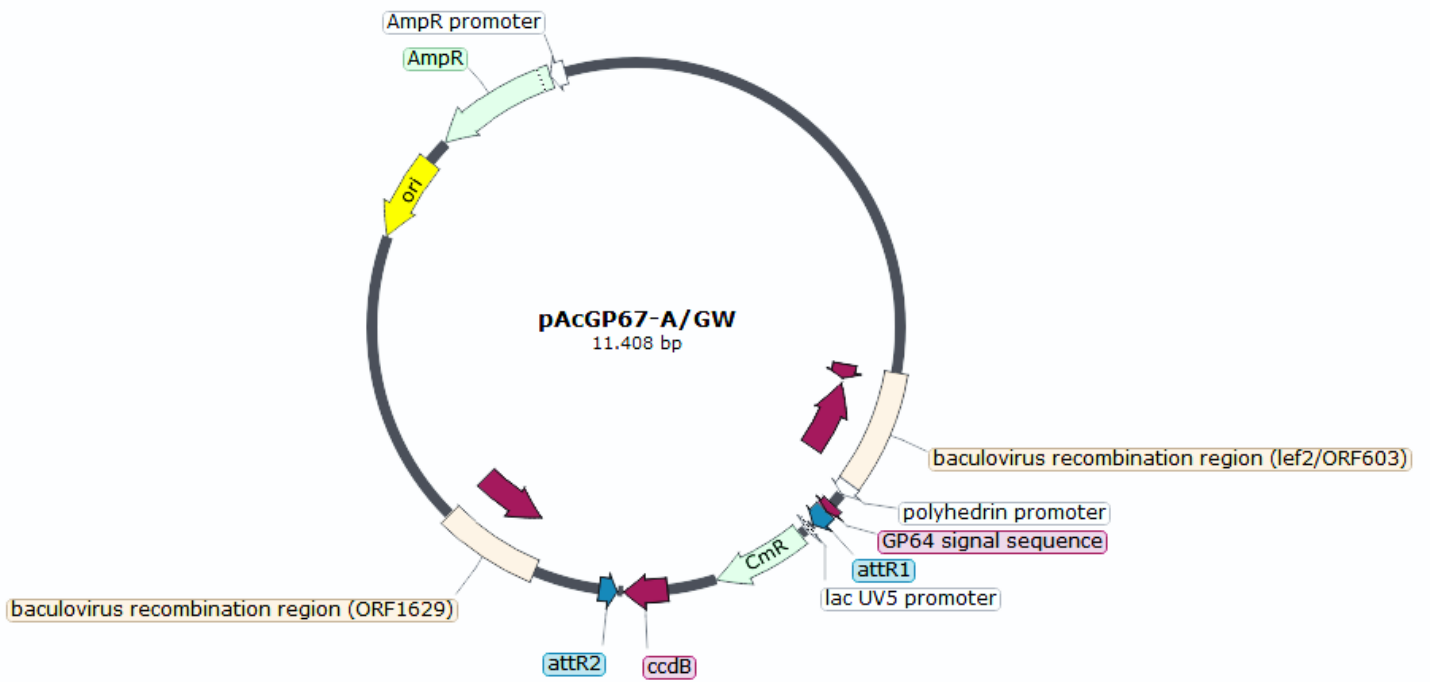
## Vectores con promotor T7 para expresión en *E. coli*: pDEST14, pDEST15 y pDEST17



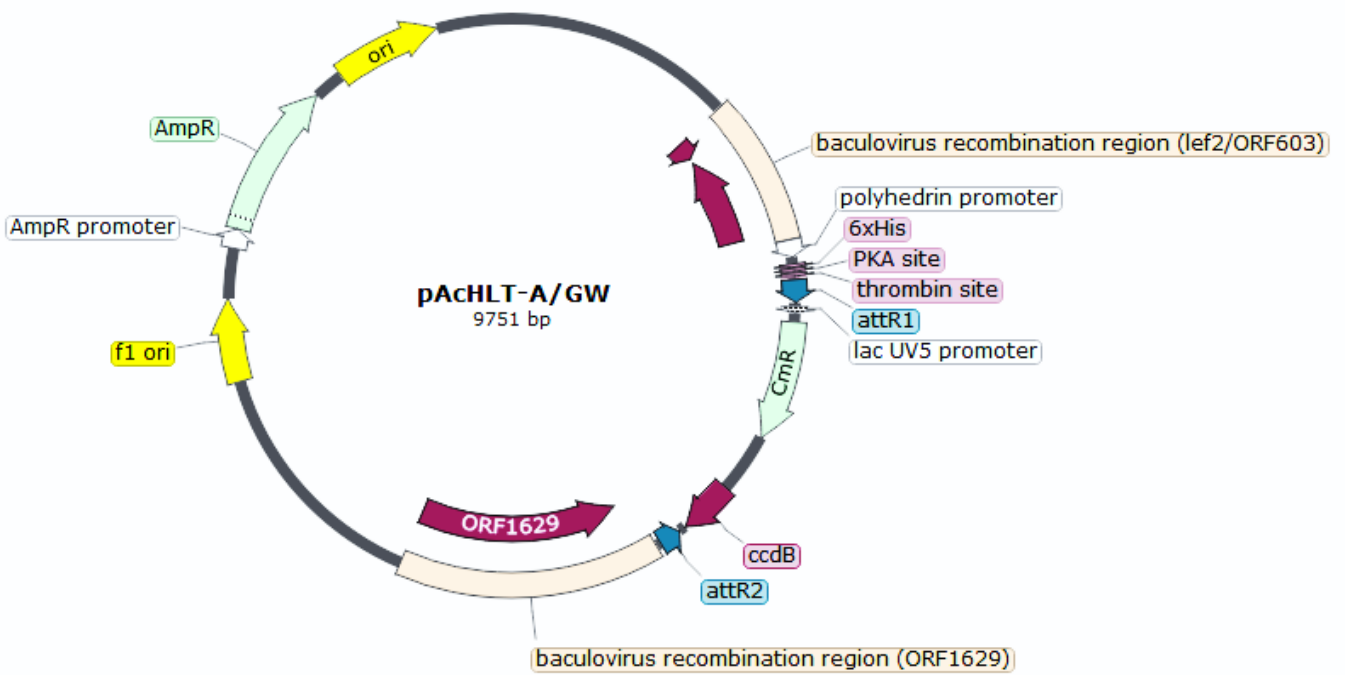
### Cassette Gateway



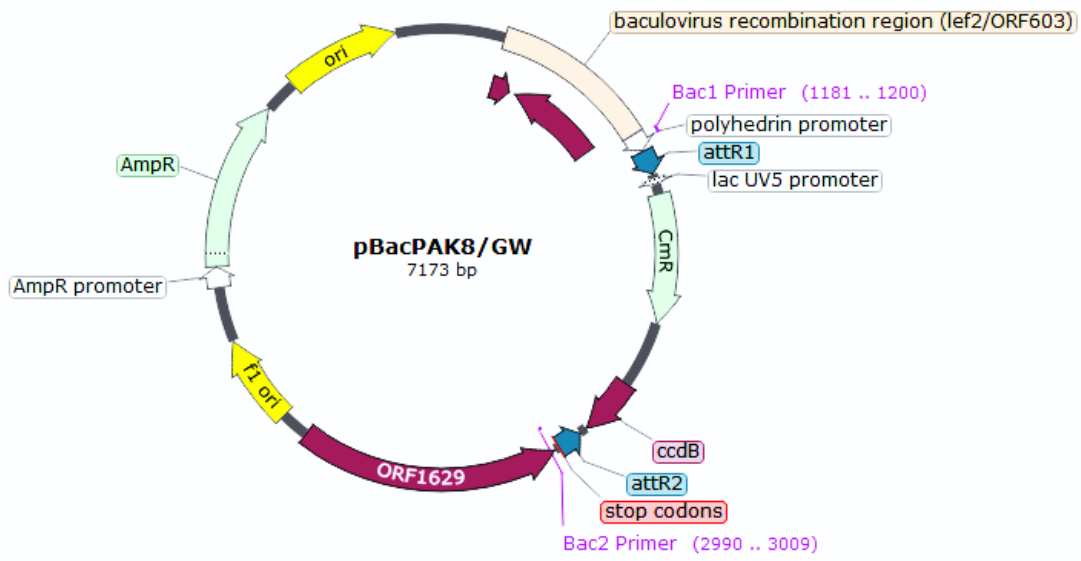
## pAcGP67-A/GW



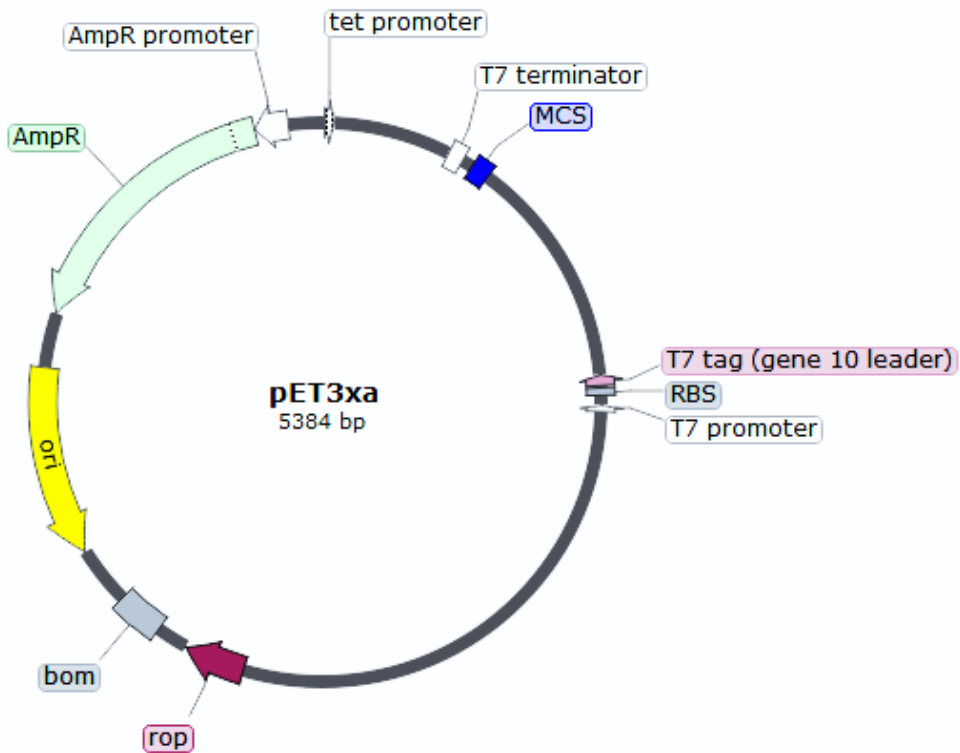
## pAcHLTA/GW



## pBacPAK8/GW



## pET3xa



## Anexo II. Secuencias de aminoácidos de las proteínas recombinantes

### GST-VP6 PRVA

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYI  
 DGDVKLTSMAIRYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVLDIRYGVSR IAYSKDFETL  
 KVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFP  
 KLVCFKKRIEAI PQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPKSDLVPRPWSNQTSLY  
 KKAGSEFALMEVLYSLSKTLKDARDKIVEGTLYSNISDLIQQFNQMIVTMNGNDFQ  
 TGGIGNLPIRNWNFDFGLLGTLLNIDANYVENARTTIEYFIDFIDNVCMDMARE  
 SQRNGIAPQSEALRKLSGIKFKRINFDNSSDYIENWNLQNRRTGFVVFHKPNILPY  
 SASFTLNRSQPAHDNLMGTMWINAGSEIQVAGFDYSCAFNAPANIQQFEHV VPLR  
 RALTTATITLLPDAERFSFPRVINSADGATTWYFNPVIIRPSNVEVEFLLNGQIINTY  
 QARFGTHIARNFDTIRLSFQLVRPPNMTPAVANLFPQAPPFIFHATVGLTLRIESAVC  
 ESLADASETLLANVTAVRQEYAI PVGPFPPGMNWTEELITNYSREDNLQRVFT  
 VASIRSMLIK\*

Número de aminoácidos: 639

Peso molecular (kDa): 73,0

pI teórico: 6,02

### 6xHis-VP6 PRVA (*E. coli*)

MSYYHHHHHHLESTSLYKKAGSEFALMEVLYSLSKTLKDARDKIVEGTLYSNISDLI  
 QQFNQMIVTMNGNDFQTGGIGNLPIRNWNFDFGLLGTLLNIDANYVENARTTIE  
 YFIDFIDNVCMDMARE SQRNGIAPQSEALRKLSGIKFKRINFDNSSDYIENWNLQ  
 NRRTGFVVFHKPNILPYSASFTLNRSQPAHDNLMGTMWINAGSEIQVAGFDYSCAF  
 NAPANIQQFEHV VPLRRALTTATITLLPDAERFSFPRVINSADGATTWYFNPVIIRPS  
 NVEVEFLLNGQIINTYQARFGTHIARNFDTIRLSFQLVRPPNMTPAVANLFPQAPPFI  
 FHATVGLTLRIESAVCESVLADASETLLANVTAVRQEYAI PVGPFPPGMNWTELI  
 TNYSREDNLQRVFTVASIRSMLIK\*

Número de aminoácidos: 423

Peso molecular (kDa): 47,9

pI teórico: 6,22

## 6xHis-VP6 PRVA (BVES)

MGHHHHHHGRRRASVAAGILVPRGSPGLDGICSIEEFRITSLYKKAGSEFALME  
VLYSLSKTLKDARDKIVEGTLYSNISDLIQQFNQMIVTMNGNDFQTGGIGNLPIRN  
WNFDGLLGTLLNIDANYVENARTTIEYFIDFIDNVCMDMARESQRNGIAPQSE  
ALRKLSGIKFKRINFDNSSDYIENWNLQNRQRRTGFVVFHKPNILPYSASF TLNRSQP  
AHDNLMGTMWINAGSEIQVAGFDYSCAFNAPANIQQFEHV VPLRRALTTATITLL  
PDAERFSFPRVINSADGATTWYFNPVIIRPSNVEVEFLLNGQIINTYQARFGTHIARN  
FDTIRLSFQLVRPPNMTPAVANLFPQAPPFIFHATVGLTLRIESAVCESVLADASET  
LLANVTAVRQEYAIPVGPVFPFGMNWTELITNYSRREDNLQRVFTVASIRSMLIK\*

Número de aminoácidos: 449

Peso molecular (kDa): 50,4

pI teórico: 6,81

## VP6 PRVA (BVES, intracelular)

MEVLYSLSKTLKDARDKIVEGTLYSNISDLIQQFNQMIVTMNGNDFQTGGIGNLPI  
RNWNFDGLLGTLLNIDANYVENARTTIEYFIDFIDNVCMDMARESQRNGIAPQ  
SEALRKLSGIKFKRINFDNSSDYIENWNLQNRQRRTGFVVFHKPNILPYSASF TLNRS  
QPAHDNLMGTMWINAGSEIQVAGFDYSCAFNAPANIQQFEHV VPLRRALTTATIT  
LLPDAERFSFPRVINSADGATTWYFNPVIIRPSNVEVEFLLNGQIINTYQARFGTHIA  
RNFDTIRLSFQLVRPPNMTPAVANLFPQAPPFIFHATVGLTLRIESAVCESVLADAS  
ETLLANVTAVRQEYAIPVGPVFPFGMNWTELITNYSRREDNLQRVFTVASIRSML  
IK\*

Número de aminoácidos: 397

Peso molecular (kDa): 44,8

pI teórico: 5,70

**gp64-VP6 PRVA (BVES, extracelular)**

**MLLVNQSHQGFNKEHTSKMVSAIVLYVLLAAAAHSAFAADPITSLYKKAGSEFALMEVLYS  
 LSKTLKDARDKIVEGTLYSNISDLIQQFNQMIVTMNGNDFQTGGIGNLPIRNWNFD  
 FGLLGTLLNIDANYVENARTTIEYFIDFIDNVCMDEMARESQRNGIAPQSEALRK  
 LSGIKFKRINFDNSSDYIENWNLQNRRTGTFVFKPNILPYSASFNLNRSQPAHDN  
 LMGTMWINAGSEIQVAGFDYSCAFNAPANIQQFEHVPLRRALTTATITLLPDAER  
 FSPRVINSADGATTWYFNPVIIRPSNVEVEFLLNGQIINTYQARFGTIIARNFDTIRL  
 SFQLVRPPNMTPAVANLFPQAPPFIFHATVGLTLRIESAVCESVLADASETLLANVT  
 AVRQEYAIPVGPVFPFGMNWTELITNYSRREDNLQRVFTVASIRSMLIK\***

*La región marcada en cursiva se elimina en el proceso de secreción por corte proteolítico*

Número de aminoácidos: 414

Peso molecular (kDa): 46,6

pI teórico: 5,72

**gp64-6xHis-NP SIV**

**MLLVNQSHQGFNKEHTSKMVSAIVLYVLLAAAAHSAFAADPITSLYKKAGSEFALMHHHH  
 HHASQGTKRSYEQMETDGERQNATEIRASVKGKMGIGRIFYIQMCTELKLSXYEG  
 RLIQNSLTIERMVLSAFDERRNKYLEEHPSAGKDPKKTGGPIYRRVNGKWMRELI  
 LYDKEEIRRIWRQANNGDDATAGLTHMMIWHSNLNDATYQRTRALVRTGMDPR  
 MCSLMQGSTLPRRSGAAGAAVKGVGTMVMELVMIKRGINDRNFWRGENGRKT  
 RIAYERM CNILKGKFQTAAQKAMMDQVRESRNP GNAEFEDLTF LARSALILRGSV  
 AHKSCLPACVYGPAVASGYDFEREGYSLVGIDPFRLQNSQVYSLIRPNENPAHKS  
 QLVWMACHSAAFEDLRVLSFIKGTKVLPRGKLSTRGVQIASNENMETMESSTLEL  
 RSRYWAI RTRSGGNTNQQRASAGQISIQPTFSVQRNLPFDRTTIMAAFNGNTEGRT  
 SDMRTEIIRMMESARPEDVSFQGRGVFELSDEKAASPIVPSFDMSNEGSYFFGDNA  
 EEYDX\***

Número de aminoácidos (sin gp64/con gp64): 521 / 559

Peso molecular (kDa, sin gp64/con gp64): 58,8 / 62,9

pI teórico (sin gp64/con gp64): 9,39 / 9,41

## 6xHis-P46 *Mycoplasma hyopneumoniae*

MSYYHHHHHHLESTSLYKKAGSEFALMKKMLRKKFLYSSAIYATSLASIIAFVAAGC  
GQTESGSTSDSKPQAETLKHKVSND S I R I A L T D P D N P R W I S A Q K D I I S Y V D E T E A A T S  
TITKNQDAQNNWLTQQANLSPAPKGFIIAPENGSGVGTAVNTIADKGIPIVAYDRLI  
TGSDKYDWYVSFDNEKVGELQGLSLAAGLLGKEDGAFDSIDQMNEYLKSHMPQE  
TISFYTIAGSQDDNNSQYFYNGAMKVLKELMKNSGNKIIDLSPEGENAVYVPGWN  
YGTAGQRIQSFLTINKDPAGGNKIKAVGSKPASIFKGFLAPNDGMAEQAITKLE  
GFDTQKIFVTGQDYNDKAKTFIKDGDQNMITYKPKVGLGKVAVEVLRVLIAKKN  
KASRSEVENELKAKLPNISFKYDNQTYKVQGKNINTILVSPVIVTKANVDNPDA\*

Número de aminoácidos: 445

Peso molecular (kDa): 48,8

pI teórico: 7,68

## P46 *Mycoplasma hyopneumoniae*

MKKMLRKKFLYSSAIYATSLASIIAFVAAGCGQTESGSTSDSKPQAETLKHKVSND  
S I R I A L T D P D N P R W I S A Q K D I I S Y V D E T E A A T S T I T K N Q D A Q N N W L T Q Q A N L S P A P K  
G F I I A P E N G S G V G T A V N T I A D K G I P I V A Y D R L I T G S D K Y D W Y V S F D N E K V G E L Q G L S  
L A A G L L G K E D G A F D S I D Q M N E Y L K S H M P Q E T I S F Y T I A G S Q D D N N S Q Y F Y N G A M K  
V L K E L M K N S G N K I I D L S P E G E N A V Y V P G W N Y G T A G Q R I Q S F L T I N K D P A G G N K I K  
A V G S K P A S I F K G F L A P N D G M A E Q A I T K L K L E G F D T Q K I F V T G Q D Y N D K A K T F I K D  
G D Q N M T I Y K P D K V L G K V A V E V L R V L I A K K N K A S R S E V E N E L K A K L P N I S F K Y D N Q  
T Y K V Q G K N I N T I L V S P V I V T K A N V D N P D A \*

Número de aminoácidos: 419

Peso molecular (kDa): 45,7

pI teórico: 7,60

## 6xHis-Cap PCV2

MSYYHHHHHHLESTSLYKKAGSEFALMTYPRRRYRRRRHRPRSHLGQILRRRPWL  
VHPRHRYRWRRKNGIFNTRLSRTFGYTVKATTVRTPSWAVDMMRFNIDDFVPPG  
GGTNKISIPFEYYRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVGSTAVILDDNFVTKATALTYDP  
YVNYSSRHTIPQPFSYHSRYFTPKPVL DSTIDYFQPNNKRNQLWLRLQTSRNV DHV  
GLGTAFENSIYDQDYNIRVTMYVQFREFNLKDPPLKP\*

Número de aminoácidos: 259

Peso molecular (kDa): 31

pI teórico: 10,39

## Cap PCV2

MTYPRRRYRRRRHRPRSHLGQILRRRPWL VHPRHRYRWRRKNGIFNTRLSRTFG  
YTVKATTVRTPSWAVDMMRFNIDDFVPPGGGTNKISIPFEYYRIRKVKVEFWPCSP  
ITQGDRGVGSTAVILDDNFVTKATALTYDPYVNYSSRHTIPQPFSYHSRYFTPKPVL  
DSTIDYFQPNNKRNQLWLRLQTSRNV DHVGLGTAFENSIYDQDYNIRVTMYVQFR  
EFNLKDPPLKP\*

Número de aminoácidos: 233

Peso molecular (kDa): 27,9

pI teórico: 10,67

## P10-N (PRRSV-1)

MASMTGGQQMGTNQGKGVVAAGDKLALFLKVFGEVLTAFARTSVTTSRHMVRSISS  
GKSAQFPVLGRTQAAYLAPGENLDDKRKDIKHTEKVITIDGLLTADVLIYDIEDAMNHY  
DVRSEYTSQLGESLAMAADGAVLAEIAGLCNVESKY NENIEGLGTATVIETTQNK AAL  
TDQVALGKEIIAALTKARAALTKNYVPAADR VFYCDPDSYSAILAALMPNAANYAALI  
DPEKGSIRNVMGFEVVEVPHLTAGGAGTGSMAGKNQSQK KKKSAAPMGNGQP VNQ  
LCQLLGAMIKSQRQQPRGGQAKKKKPEKPHFPLAAEDDIRHHLTQTERS LCLQSI  
QTAFNQGAGTASLSSSGKVSFQVEFMLPVAHTVRLIRVTST SASQGAS\*

Número de aminoácidos: 390

Peso molecular (kDa): 41,3

pI teórico: 8,86

## P10-N (PRRSV-2)

MASMTGGQQMGTNQGKGVVAAGDKLALFLKVFGEVLTAFARTSVTTSRHMVRSISS  
GKSAQFPVLGRTQAAYLAPGENLDDKRKDIKHTEKVITIDGLLTADVLIYDIEDAMNHY  
DVRSEYTSQLGESLAMAADGAVLAEIAGLCNVESKYNENIEGLGTATVIETTQNKAAL  
TDQVALGKEIIAALTKARAALTKNYVPAADR VFYCDPDSYSAILAALMPNAANYAALI  
DPEKGSIRNVMGFVVEVPHLTAGGAGTGSMNNNGKQKQKRRKKGDPVNQLCQ  
MLGKIIAQQNQSRGKGP GKKKNKKKNPEKPHFPLATEDDVRHHFTP SERQLCLSSI  
QTA FNQ GAGTCTLS DSGRISYTFEFSLP THHTVRLIRVTASPSA\*

Número de aminoácidos: 385

Peso molecular (kDa): 41,1

pI teórico: 8,64

## P10-N quimera

MASMTGGQQMGTNQGKGVVAAGDKLALFLKVFGEVLTAFARTSVTTSRHMVRSISS  
GKSAQFPVLGRTQAAYLAPGENLDDKRKDIKHTEKVITIDGLLTADVLIYDIEDAMNHY  
DVRSEYTSQLGESLAMAADGAVLAEIAGLCNVESKYNENIEGLGTATVIETTQNKAAL  
TDQVALGKEIIAALTKARAALTKNYVPAADR VFYCDPDSYSAILAALMPNAANYAALI  
DPEKGSIRNVMGFVVEVPHLTAGGAGTGSPTSSSMAGKNQSQK K K K S A A P M G N G Q  
P V N Q L C Q L L G A M I K S Q R Q Q P R G G Q A K K K K P E K P H F P L A A E D D I R H H L T Q T E R S L  
C L Q S I Q T A F N Q G A G T A S L S S S G K V S F Q V E F M L P V A H T V R L I R V T S T S A S Q G A S G G G  
G S G G G S G G G S L C Q M L G K I I A Q Q N Q S R G K G P G K K N K K K N P E K P H F P L A T E D D V  
R H H F T P S E R Q L C L S S I Q T A F N Q G A G T C T L S D S G R I S Y A V E F S L P T H H T V R L I R V T A S  
P S A\*

Número de aminoácidos: 512

Peso molecular (kDa): 53,9

pI teórico: 9,24

## 6xHis-VP30 ASFV

MGHHHHHHGRRRASVAAGILVPRGSPGLDGICSIEEFRITSLYKKAGSEFALMD  
FILNISMKMEVIFKTDLRSSSQVVFHAGSLYNWFSVEIINSGRIVTTAIKTLLSTVKY  
DIVKSAHIYAGQGYTEHQAQEEWNMILHVLFEETESSASSESIHEKNDNETNECT  
SSFETLFEQEPSSEEPKDSKLYMLAQKTVQHIEQYGKAPDFNKVIRAHNFIQTIHGT  
PLKEEEEKEVVRLMVIKLLKKNKLLSHLHLMF\*

Número de aminoácidos: 256

Peso molecular (kDa): 29,2

pI teórico: 6,34

## E2 CSFV

MRLACKEDYRYAISSTNEVGLLGAEGLTWTWKEYSHDLQLNDGTVKAICVAGSFK  
VIALNVVSRRYLASMHKRASLTSVTFELLFDGTPSTEEMGDDFGFGLCPFDTSVP  
VKGKYNATLLNGSAFYLVCPIGWTGVIECTAVSPTTLRTEVVKTFRREKPFPHRM  
DCVTTTVENEDLFYCKFGGNWTCVKGEPVVYTGGLVKQCRWCGFDFNEPDGLP  
HYPIGKCILANETGYRIVDSTDCNRDGVVISTNGSHECMIGNTTVKVHASDERLGP  
MPCRPKEIVPSAGPVXKTSCTFNYAKTLKNKYYEPRDSYFQQYMLKGEYQYWFD  
LDVTDRHSDYFAEF\*

Número de aminoácidos: 343

Peso molecular (kDa): 38,5

pI teórico: 5,86

## *gp64-GST-MPB83 Mycobacterium bovis*

MLLVN**QSHQG**FNKEHTSKMVSAIVLYVLLAAAAHSAFADLMSPILGYWKIKGLVQPTRLLL  
EYLEEKYEEHL~~YERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDV~~KLTQSM~~AIIRYIADKH~~  
NMLGGCPKERAEISMLEGAVLDIRYGVSR~~IAYSKDFETLKVD~~FLSKLP~~EMLKMFEDRLC~~  
HKTYLNGDHVTHPDFM~~LYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCF~~KKRIEAI~~PQIDKYLKSS~~  
KYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRGSPSTSLYKKAGSEFAL**MFLAGCSSTKPVS**  
**QDTSPK**PATSPAAPVTTAAMADPAADLIGRGCAQYAAQNPTGPGSVAGMAQDPV  
ATAASNNPMLSTLTSALSGKLNPDVNLVDTLNGGEYTVFAPTNAAFDKLPAATIDQ  
LKTDAKLLSSILTYHVIAGQASPSRIDGTHQTLQGADLTVIGARDDLMVNNAGLVC  
GGVHTANATVYMIDTVLMPPAQ\*

*La región marcada en cursiva se elimina en el proceso de secreción por corte proteolítico*

Número de aminoácidos: 444

Peso molecular (kDa): 48,4

pI teórico: 5,54

## **Anexo III. Publicaciones**