



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa de Doctorado en Biotecnología Molecular

**DISEÑO Y DESARROLLO DE UN SISTEMA INMUNOCROMATOGRÁFICO
PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA**

Tesis para optar al grado de Doctor en Biotecnología Molecular

Alumno:	Nicolás Antonio Gutiérrez Mella
Profesor Guía:	Dr. Frank Camacho Casanova
Profesor Co-Guía:	Dr. Jorge Toledo Alonso

CONCEPCIÓN-CHILE
2025

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Fisiopatología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción con. Tesis financiada por beca ANID Doctorado nacional folio 21201307.

Profesor guía

Dr. Frank Camacho Casanova
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Profesor co-guía

Dr. Jorge Toledo Alonso
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Comisión evaluadora

Dra. Coralia Rivas Rocco
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Oliberto Sánchez Ramos
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Marcelo Cortez San Martín
Evaluador Externo
Universidad de Santiago de Chile

Directora del programa

Dra. Raquel Montesino
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

INDICE GENERAL

RESUMEN	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1 Virus de la diarrea viral bovina (VDVB)	9
1.1.1 Generalidades.....	9
1.1.2 Infección permanente por VDVB	13
1.1.3 Control y diagnóstico.....	17
1.2 Anticuerpos monoclonales y su producción por técnica clásica de hibridomas	21
1.3 Anticuerpos IgY	23
1.4 Ensayos inmunocromatográficos de flujo lateral	28
2. HIPOTESIS	34
3. OBJETIVO	35
3.1 Objetivo General	35
3.2 Objetivos Específicos:.....	35
4. MATERIALES Y MÉTODOS	36
4.1 Materiales.....	36
4.1.1 Cepas bacterianas	36
4.1.2 Medios de cultivo de bacterias.....	36
4.1.3 Líneas celulares	37
4.1.4 Reactivos y soluciones de cultivo celular	37
4.1.5 Reactivos y medios de cultivo para producción de Hibridomas	38
4.1.6 Anticuerpos	39
4.1.7 Soluciones para extracción y purificación de ADN plasmidial.	40
4.1.8 Electroforesis de ADN.....	40
4.1.9 Soluciones para electroforesis de proteínas.....	40
4.1.10 Soluciones para Western blot.	41
4.1.11 Materiales y soluciones para cromatografía de afinidad a iones metálicos.	42
4.1.12 Soluciones para Inmunoensayo de ELISA	42
4.1.13 Equipos.	42
4.2 Métodos	44
4.2.1 Técnicas generales de análisis y manipulación de ADN.	44
4.2.2 Técnicas generales de análisis y manipulación de proteínas.	46
4.2.3 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (PAGE).	48
4.2.4 Western blot.	48
4.2.5 ELISA indirecto	49
4.3 Producción de y purificación de la proteína rErns	50
4.3.1 Generación de bácuido Erns-NCP.....	50
4.3.2 Cultivo celular en adhesión de células de insecto	50
4.3.3 Cultivo celular en suspensión de células de insecto	51
4.3.4 Obtención del baculovirus Erns-NCP	51
4.3.5 Selección baculovirus productores de la proteína rErns	52
4.3.6 Inmunodetección por Western blot de la proteína rErns	52
4.3.7 Amplificación del baculovirus Erns-NCP.....	53
4.3.8 Titulación del baculovirus por unidades formadoras de color	53
4.3.9 Producción proteína rErns	54
4.3.10 Purificación proteína rErns desde medio de cultivo.....	54
4.4 Generación de anticuerpos monoclonales anti-Erns	55
4.4.1 Cultivo de línea celular Sp2/0	55

4.4.2 Inmunización de ratones con la proteína rErns	55
4.4.3 Producción de hibridomas mediante fusión por polietilenglicol (PEG)	56
4.4.4 Selección de hibridomas productores de anticuerpos	57
4.4.5 Selección de clones productores de anticuerpos	58
4.4.6 Determinación de subclase de anticuerpos	58
4.4.7 Determinación de KD mediante ELISA indirecto	59
4.4.8 Purificación de anticuerpos monoclonales	60
4.5 Producción de anticuerpos policlonales IgY contra la proteína Erns e IgG murina	60
4.5.1 Inmunización de gallinas.....	60
4.5.2 Extracción de IgY desde yema de huevo	61
4.6 Elaboración y ensamblaje de ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral	62
4.6.1 Producción de nanopartículas de oro de 40 nm	62
4.6.2 Determinación de la cantidad mínima de anticuerpos a conjugar con nanopartículas de oro	62
4.6.3 Optimización del pH de trabajo para la conjugación de anticuerpos con nanopartículas de oro	63
4.6.4 Conjugación de anticuerpos con nanopartículas de oro.....	64
4.6.5 Confección de tiras reactivas	64
5. RESULTADOS	66
5.1 Generación de baculovirus para la expresión de la proteína rErns.....	66
5.2 Producción de la proteína rErns	68
5.3 Purificación de la proteína rErns.....	70
5.4 Obtención de hibridomas productores de anticuerpos anti-rErns	72
5.5 Obtención de anticuerpos monoclonales.....	73
5.5 Producción de anticuerpos policlonales IgY contra la proteína rErns e IgG murina.	77
5.6 ELISA sándwich para la detección de la proteína Erns.....	82
5.7 Producción y evaluación de prototipo de tira reactiva para la identificación de la proteína Erns del VDVB	84
5.7.1 Producción de nanopartículas de oro	84
5.7.2 Conjugación de anticuerpos con nanopartículas de oro.....	85
5.7.3 Evaluación del pH para la conjugación de anticuerpos con nanopartículas de oro.	85
5.7.4 Elaboración de prototipo de IFL para detección de la proteína Erns	87
6. DISCUSIÓN	93
6.1 Proteína rErns del VDVB obtenida desde el medio de cultivo de células SF21.....	93
6.2 Obtención de anticuerpos monoclonales anti-rErns de alta afinidad	95
6.3 Especificidad de anticuerpos IgY anti-rErns y anti-IgG murina y su uso en inmunoensayos.	97
6.4 Ensamblaje de prototipo de dispositivo IFL y desempeño.	99
7. CONCLUSIONES	106
8. GLOSARIO	107
9. BIBLIOGRAFÍA	109

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología y estructura del VDVB.....	10
Figura 2. Representación esquemática de la estructura de los anticuerpos IgY e IgG.. ...	24
Figura 3. Esquema de dispositivo Inmuncromatográfico de Flujo Lateral.....	30
Figura 4. Análisis de señal fluorescente en células transfectadas con el b́acmido Erns-NCP.....	67
Figura 5. Expresi3n de la prote3na rErns en c3lulas SF21 transducidas con los baculovirus generados.....	67
Figura 6. Expresi3n de la prote3na rErns a distintos tiempos de cultivo.....	69
Figura 7. Expresi3n de la prote3na rErns en el medio de cultivo con distintas concentraciones de infecci3n.....	70
Figura 8. Purificaci3n de la prote3na rErns desde el medio de cultivo por IMAC.	71
Figura 9. Determinaci3n de la pureza de la prote3na rErns.	72
Figura 10. Análisis de anticuerpos anti-rErns expresados en el medio de cultivo de hibridomas.....	73
Figura 11. Identificaci3n de subclase de anticuerpos obtenidos.	74
Figura 12. Purificaci3n del anticuerpo monoclonal anti-Erns mediante cromatograf3a de afinidad a prote3na G..	74
Figura 13. Titulaci3n de anticuerpos monoclonales anti-Erns mediante ELISA indirecto.	75
Figura 14. Detecci3n de la prote3na rErns por los anticuerpos monoclonales en t3cnica de Western blot.	76
Figura 15. Estimaci3n de la KD de la interacci3n rErns-anticuerpo monoclonal mediante ELISA Indirecto.	77
Figura 16. Evaluaci3n de la pureza de anticuerpos IgY extra3dos de yema de huevo.	77
Figura 17. T3tulo de anticuerpos IgY anti-rErns.....	79
Figura 18. Reconocimiento de prote3na rErns por anticuerpos IgY anti-rErns en inmunoensayo de <i>Western blot</i>	80
Figura 19. T3tulo de anticuerpo IgY anti-IgG murina.	81
Figura 20 Reconocimiento de IgG murina por anticuerpos IgY anti-IgG murina en inmunoensayo de Western blot.....	82
Figura 21 Esquema de ELISA sándwich para detecci3n de la prote3na rErns.	83
Figura 22. Detecci3n de la prote3na rErns mediante ELISA sándwich utilizando parejas de anticuerpos monoclonales y aviares IgY.....	83
Figura 23. Producci3n de AuNPs de 40 nm. Estudio del tama3o y forma de AuNPs generadas.	84
Figura 24. Obtenci3n de un conjugado estable de anticuerpos con AuNPs.....	86
Figura 25 . Evaluaci3n de estabilidad del anticuerpo F5C4 conjugado con nanopart3culas de oro a distintos rangos de pH.....	87
Figura 26. Esquema del dise3o del dispositivo IFL para la detecci3n de la prote3na Erns.	88
Figura 27. Evaluaci3n del prototipo IFL utilizando diferentes anticuerpos monoclonales conjugados con nanopart3culas de oro.....	88
Figura 28. Efecto de distintas concentraciones de anticuerpo F5C4 conjugado en ensayo de IFL.....	90
Figura 29. Análisis del l3mite de detecci3n de prote3na rErns en el prototipo de IFL ensamblado.	91
Figura 30. Evaluaci3n de sueros negativos en prototipo de IFL ensamblado..	92

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación de la producción de anticuerpos IgG (conejo) e IgY	25
--	----

RESUMEN

El virus de la diarrea viral bovina es un problema sanitario en los planteles bovinos alrededor del mundo. Actualmente, con el desarrollo de los métodos de diagnósticos, ha sido posible la implementación de programas de control y erradicación para este patógeno basados en la detección de animales persistentemente infectados (PI). En nuestro país, según el Servicio Agrícola y Ganadero, la infección con este virus es de notificación obligatoria, pero no existe ningún programa para el control de esta enfermedad y tampoco dispositivos que permitan la evaluación de los animales en terreno. El objetivo de este proyecto es el diseño y generación de un sistema de detección rápida por inmunocromatografía (tira reactiva o prueba de flujo lateral) para el virus de la diarrea viral bovina. Para esto se produjo la proteína de la cápside viral Erns de manera recombinante en células de insecto, con la cual se realizó la inmunización de ratones y gallinas para la obtención de anticuerpos monoclonales IgG y aviares IgY, respectivamente. Los anticuerpos monoclonales obtenidos se marcaron con nanopartículas de oro (AuNPs), y los anticuerpos aviares IgY anti-rErns e IgG anti-ratón se imprimieron en una membrana de nitrocelulosa para el montaje final del sistema inmunocromatográfico. El ensayo de flujo lateral propuesto detecta hasta 25 ng de la proteína rErns demostrando que puede convertirse en una herramienta para el diagnóstico de animales PI con el VDVB.

ABSTRACT

Bovine viral diarrhoea virus is a health problem in cattle herds around the world. Currently, with the development of diagnostic methods, it has been possible to implement control and eradication programs for this pathogen based on the detection of persistently infected animals (PI). In our country, according to the Servicio Agrícola y Ganadero, infection with this virus is notifiable, but there is no program for the control of this disease and there are no devices that allow the evaluation of animals in the field. The aim of this project is to design and generate a rapid detection system by immunochromatography (test strip or lateral flow test) for bovine viral diarrhoea virus. For this purpose, the viral capsid protein Erns was produced recombinantly in insect cells, with which mice and hens were immunized to obtain IgG monoclonal antibodies and IgY antibodies, respectively. The monoclonal antibodies were labelled with gold nanoparticles (AuNPs), and the avian IgY anti-Erns and IgG anti-mouse antibodies were printed on a nitrocellulose membrane for the final assembly of the immunochromatographic system. The proposed lateral flow assay detects up to 25 ng of rErns protein demonstrating that it can become a tool for the diagnosis of PI animals with BVDV.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Virus de la diarrea viral bovina (VDVB)

1.1.1 Generalidades

El Virus de la diarrea viral bovina (VDVB), es un virus envuelto de ARN simple cadena perteneciente al género pestivirus y forma parte de la familia *Flaviviridae*. El genoma de este virus codifica para una única poliproteína, la cual es procesada por proteasas generando proteínas estructurales y no estructurales (Figura 1). El grupo de las proteínas no estructurales está compuesto por las proteínas N^{pro}, NS2/NS3, NS4A, NS4B, NS5A, y NS5B, las cuales están involucradas en la replicación del ARN viral (K. H. Choi et al., 2006). Dentro del grupo de proteínas estructurales encontramos 4 proteínas: las proteínas Erns (E0), E1, E2 y la proteína de la cápside C, que se localizan en la superficie del virus (Krey et al., 2012; Simmonds et al., 2017).

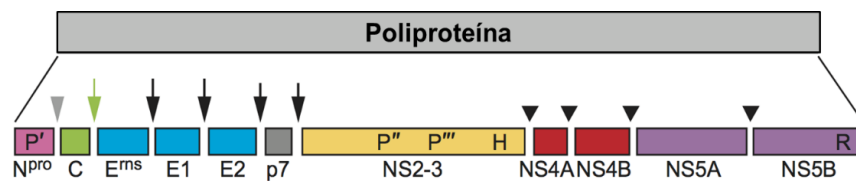
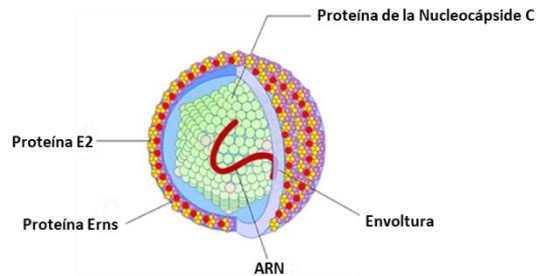


Figura 1. Morfología y estructura del VDVB. Ilustración de la partícula del virus del VDVB y sus proteínas estructurales y no estructurales(modificado de Al-Kubati et al., 2021, Simmonds et al., 2017).

La proteína N^{pro} es la primera proteína en ser traducida y tiene una actividad autoproteolítica (Neill, 2013; J. F. Ridpath, 2005). La proteína Erns es una glicoproteína de entre 44-48 kDa que posee 7 sitios de N-glicosilación (F.-I. Wang et al., 2015), la cual tiene una actividad ARNasa (Schneider et al., 1993) que se ha demostrado facilita la evasión de la respuesta antiviral mediada por interferón (IFN) en el hospedero favoreciendo, por tanto, el establecimiento de animales persistentemente infectados (PI) (Meyers et al., 2007). Erns posee un sitio de anclaje transmembrana atípico careciendo de una hélice transmembrana lo cual, ha sido relacionado con la excreción de esta proteína al espacio extracelular (Fetzer et al., 2005; Rügenapf et al., 1993). Las proteínas E1 y E2 son las involucradas en el proceso de internalización celular del virión (Omari et al.,

2013). La proteína E1 es el componente menos caracterizado del virión, y hasta ahora no se han analizado en detalle ni su estructura ni su función, pero se ha descrito que E1 forma heterodímeros con la proteína E2 y que estos permiten la entrada del virus a la célula (Qi et al., 2022). La proteína E2 es la proteína más abundante de la envoltura del virus y la proteína que induce la mayor respuesta inmune seguido por la proteína Erns (Al-Kubati et al., 2021). La proteína NS2/NS3 es procesada mediante la función autoproteasa de la proteína NS2 (Neill, 2013; Tautz et al., 2015), siendo esta función esencial para el clivaje de las proteínas NS2 y NS3 y la replicación viral (Lackner et al., 2004; Mathapati et al., 2010). La proteína NS3 posee una doble actividad enzimática: en la región N-terminal contiene un dominio serina proteasa involucrado en el clivaje de las proteínas virales ubicadas posterior a NS3, mientras que en la región C-terminal presenta un dominio RNA helicasa y NTPasa (Neill, 2013; J. F. Ridpath, 2005; Tautz et al., 2015). La proteína NS4A actúa como cofactor de NS3, siendo necesaria para la actividad de la serina proteasa (Neill, 2013). En cuanto a la proteína NS4B, se ha demostrado formar parte del complejo de replicación viral junto con NS5A y NS5B esta última es una RNA polimerasa-RNA dependiente involucrada en la replicación del RNA viral (Neill, 2013; J. F. Ridpath, 2005).

El VDVB se divide en 2 genotipos, VDVB-1 y VDVB-2, los que difieren en genética y antigenicidad (Vilcek et al., 2005) y estos a su vez se dividen en 22 subtipos de VDVB-1 (1a-1v) y 4 subtipos de VDVB-2 (2a-2d) (Y. Wang & Pang, 2024). Además, basados en su actividad citopática en cultivos celulares, el VDVB se

encuentra subclasificado en virus citopáticos (CP) y no-citopáticos (NCP), siendo la variante NCP el que se encuentra con mayor frecuencia en la naturaleza (J. F. Ridpath, 2008).

El VDVB se considera un patógeno importante a nivel mundial para la industria ganadera y el agente causal de la diarrea viral bovina (DVB), una enfermedad que se encuentra en la lista de notificación obligatoria del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). Estudios realizados han demostrado la presencia de los subtipos 1a, 1b, 1d, 1e, 1j y del genotipo VDVB-2 (Donoso et al., 2018; Hugues et al., 2023; Pizarro-Lucero et al., 2006). Aunque se trata de una enfermedad de denuncia obligatoria, el tratamiento preventivo ni las pruebas para la detección del VDVB lo son. Según el informe de sanidad animal de 2017 emitido por el SAG, el VDVB está presente en los planteles bovinos de nuestro país y señala que la DVB fue la enfermedad más diagnosticada dentro de las patologías de la lista de denuncia obligatoria para bovinos. El año 2020, del total de denuncias de bovinos enfermos ante el SAG, el 39,94% correspondió a un diagnóstico de diarrea viral bovina (SAG, 2021). Un estudio publicado el año 2022 señala una prevalencia del 76% en los predios del sur de Chile (Alocilla & Monti, 2022). Este virus induce estados de inmunosupresión, favoreciendo el desarrollo de neumonías bacterianas secundarias (Grooms et al., 2014) y los signos más característicos son leucopenia transitoria, fiebre, descargas nasales, tos, disnea, diarreas (Tautz et al., 2015). Las consecuencias más graves relacionadas a este patógeno son las afecciones reproductivas produciendo fallas en la fertilización

de las hembras y muerte embrionaria (Grooms, 2004). Este agente infeccioso es el causante de grandes pérdidas económicas en la industria ganadera mundial (Khodakaram-Tafti & Farjanikish, 2017) y tiene efectos negativos en distintos aspectos de la industria, como la disminución de la capacidad reproductiva de los animales, la reducción de la producción de leche, la menor ganancia de peso y el aumento de la mortalidad de los animales (Campbell, 2004; Oguejiofor et al., 2019; Yitagesu et al., 2021; Yue et al., 2021). Estudios realizados muestran que a nivel mundial se generan pérdidas de 687 USD por cabeza de ganado (Richter et al., 2017) y, en EE. UU., teniendo en consideración las pérdidas por animal infectado, se estiman pérdidas totales entre 460 y 767 millones de USD (Givens & Newcomer, 2015).

1.1.2 Infección permanente por VDVB

El VDVB se ha observado que se replica en el tejido epitelial (boca, mucosa nasal), el sistema nervioso central, linfocitos de sangre periférica, la médula ósea y el tejido linfoide. Además, puede infectar las principales células somáticas del tracto reproductivo, como los ovocitos (Qi et al., 2022). El VDVB entra a la célula mediante un proceso de endocitosis mediada por clatrina (Mathapati et al., 2010). En este proceso se ven involucradas las proteínas estructurales E2 en su forma heterodimérica con la proteína estructural E1 (Neill, 2013; Qi et al., 2022; Riedel et al., 2020; Ronecker et al., 2008), los cual interactúa con el receptor CD46 presente en casi todas las células nucleadas, permitiendo la entrada del virus a

la célula (Maurer et al., 2004; Workman et al., 2023). La infección por VDVB produce una inmunosupresión con ausencia de signos clínicos que puedan evidenciar una infección primaria con el virus (Brackenbury et al., 2003; J. Ridpath, 2010). En el ganado existen patógenos que pueden infectar en etapas tempranas de estadio fetal y establecer un estado denominado persistentemente infectados (PI). Los animales PI son aquellos que están infectados por un agente patogénico y permanecen así durante el resto de su vida sin generar una respuesta específica contra sus antígenos, produciendo una baja o total ausencia de anticuerpos contra el VDVB (Brownlie et al., 2000). En el caso del VDVB, el subtipo NCP es el que induce este estado, infectando el feto a través de una transmisión vertical desde la madre infectada. Los factores importantes que influyen en la transmisión vertical del virus son el estado inmunológico de la madre, la etapa de gestación en el momento de la infección, y la variante del virus que causa la infección (debe ser la variante NCP) (Brodersen, 2014). Se determinó que el periodo de ventana para la generación de un animal PI puede variar entre los 25 y 90 días de gestación aproximadamente, pero puede producirse en ocasiones tan tempranas como a los 18 días o tan tardías como a los 125 días (Grooms, 2004). La infección con VDVB en hembras reproductoras pueden tener consecuencias asociadas a problemas con la concepción, pérdidas embrionarias tempranas, abortos y defectos congénitos, además del nacimiento de terneros PI con anomalías múltiples. Cuando la infección se produce en etapas tempranas del desarrollo intrauterino, antes de que el animal desarrolle

una respuesta inmune, crea una inmunotolerancia que es específica de la cepa viral (Peterhans et al., 2003). La cepa NCP del VDVB inhibe la producción de interferones del tipo 1, conocidos por tener un efecto antiviral, por lo tanto, el feto se encuentra desprotegido frente al virus, permitiendo que este se establezca y se genere un animal PI (Peterhans & Schweizer, 2013). En este proceso de evasión del sistema inmune se encuentran involucradas 2 proteínas virales, las proteínas Erns y N^{pro}. Esta última, induce la degradación del factor de transcripción IRF-3 relacionado con la producción de IFN de tipo 1 (Gil et al., 2006; Hilton et al., 2006). En la familia Flaviviridae, la proteína estructural Erns es exclusiva de los pestivirus (F.-I. Wang et al., 2015). Esta proteína estructural alberga un dominio activo RNasa de la superfamilia T2 RNasa (Iqbal et al., 2004). Esta actividad RNasa de Erns puede inducir apoptosis en linfocitos (Bruschke et al., 1997; F.-I. Wang et al., 2015) y bloquear la síntesis de IFN tipo I, degradando ARN viral extracelular (Mätzener et al., 2009). De esta forma se evita que su material genético sea reconocido por el receptor de tipo Toll 7 (TLR-7); receptor que reconoce patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), en este caso los ARN virales, evitando que se active la respuesta antiviral (Peterhans & Schweizer, 2013). Erns desempeña un papel central en la evasión de la respuesta IFN del huésped y favorece el establecimiento y mantenimiento de la infección persistente (Meyers et al., 2007). Se ha descrito que la proteína Erns es captada por las células y endocitada mediante clatrina, uniéndose a los glicosaminoglicanos de la superficie celular (Iqbal et al., 2000). La actividad

inhibidora de la Erns se mantiene durante varios días, lo que indica su potente y prolongado efecto como antagonista del IFN viral (Zürcher et al., 2014).

El VDVB se encuentra ampliamente distribuido en animales PI, encontrándose en nódulos linfáticos, tracto gastrointestinal, células epiteliales y linfoides, pulmones, piel, timo y cerebro (Liebler-Tenorio et al., 2004). Estos animales con regularidad sufren infecciones secundarias. Esta circunstancia, unida a su susceptibilidad a contraer enfermedades mucosales, reduce su esperanza de vida (Voges et al., 2006), de manera que solo el 28 % llega a los dos años de edad (Booth & Brownlie, 2012). Los animales PI secretan el virus en mayor concentración y durante mucho más tiempo que animales infectados en los que se induce respuesta inmune basada en anticuerpos, por lo que se les considera la principal fuente o reservorio del virus (Khodakaram-Tafti & Farjanikish, 2017). El VDVB es secretado y excretado a través de múltiples vías, como la saliva, mucosidades nasales, semen, orina, leche y, en una menor medida, en las heces (Brock et al., 1998). Por tanto, se extiende rápidamente existiendo informes señalando que basta una hora de contacto de un animal seronegativo con uno PI para que este resulte infectado (J. F. Ridpath, 2008).

Estas características de los animales PI los convierte en uno de los blancos más importantes para el control y erradicación de la enfermedad.

1.1.3 Control y diagnóstico

En la industria ganadera mundial se ha optado principalmente por dos estrategias para controlar el VDVB: los programas de vacunación y los programas de identificación y eliminación. El uso de las vacunas ha demostrado su utilidad en el control de otras enfermedades en el ámbito veterinario, como por ejemplo la peste porcina clásica (Postel et al., 2018) que también es producida por un pestivirus (Virus de la peste porcina clásica). En el caso del VDVB se encuentran a disposición vacunas como BOVILIS® VISTA 5 de MSD animal Health (Virus inactivado), Bayovac Horizon 10 de Bayer (virus vivo atenuado) y CATTLE MASTER® 4+L5 de Pfizer (virus inactivado). Las vacunas vivas atenuadas, si bien son capaces de generar una respuesta inmune rápida, no son recomendadas en algunos casos como hembras preñadas o animales de menos de 7 semanas. Las vacunas de virus inactivado pueden aplicarse en cualquier momento y situación, pero se necesitan refuerzos y su efecto protector se observa a partir de las 4 semanas, a diferencia de las vacunas vivo atenuadas, que confieren protección a los pocos días de su administración (Moennig & Becher, 2018) Aunque, la opción de la vacunación es una de las más utilizadas para el control de enfermedades infecciosas por su efectividad y bajo costo, el caso del VDVB es singular. Se ha observado que se necesita de una inmunidad del 100% de la población para evitar el surgimiento de nuevos animales PI, lo cual solo se ha reportado en predios pequeño (Ståhl & Alenius, 2011).

En áreas donde no hay un programa de vacunación contra el VDVB, se han

centrado en el desarrollo de protocolos de identificación y eliminación del virus. Un ejemplo de esto son algunos países escandinavos, quienes fueron los primeros en aprovechar los métodos diagnósticos masivos. Primero, realizando una búsqueda general de animales infectados y, después, un seguimiento e identificación de los animales PI. Muchos de estos programas fueron exitosos y se declararon libres de VDVB. Además, estudios posteriores confirmaron que estos programas tienen una relación coste-beneficio favorable (Valle et al., 2005). Basándose en los resultados obtenidos en lugares como Noruega, Finlandia (Rikula et al., 2005) y Dinamarca (Bitsch et al., 2000), otros países comenzaron a utilizar o replicar el mismo sistema, tal como lo hizo Austria en 2004 (Marschik et al., 2018) y Suiza el 2008, en donde se realizan pruebas serológicas periódicas para mantener los predios controlados (Thomann et al., 2017). Estos estudios demuestran la importancia de los métodos de diagnóstico para llevar a cabo este tipo de seguimientos, que actualmente se realizan en lugares donde se ha implementado un programa de detección y erradicación del VDVB. En el mercado existe una amplia gama de productos para la detección del VDVB y la identificación de animales PI, los cuales se basan en diferentes técnicas o aproximaciones para la detección del virus como: la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, inmunodetección por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de antígenos o anticuerpos e inmunohistoquímica (IHC) (Dubovi, 2013). Un trabajo realizado en 2007 comparó distintos sistemas de diagnóstico y demostró que el uso de ensayos de ELISA

para la detección de antígenos, kits de PCR y detección por IHC poseen una alta correlación (96 %) con un error aproximado de entre el 0,7 y el 1 % (Hilbe et al., 2007). Otro trabajo del mismo año también compara distintos métodos de detección y concluye que las diferentes técnicas utilizadas son opciones fiables para la detección de animales PI, pero que cada una debe implementarse correctamente y con personal formado para obtener resultados confiables (Edmondson et al., 2007). Esto demuestra que la elección del sistema de detección se basa finalmente en la simplicidad de la técnica, en las capacidades y en los recursos económicos disponibles para implementar el método elegido. Teniendo esto en cuenta, muchos países han optado por la técnica ELISA, ya que supone un bajo coste de implementación en comparación con las técnicas RT-PCR y IHC. Estas técnicas, además del alto coste de los reactivos necesitan de personal altamente calificado y entrenado para implementar la técnica, así como una infraestructura y equipos específicos. En nuestro país no existe un programa de control del VDVB, pero según el Instructivo técnico para el diagnóstico de enfermedades pecuarias, mediante técnica ELISA para la certificación de exportación de bovinos en pie del SAG, los kits de detección para la DVB aprobados son IDEXX, BVDV Ag/Serum Plus y IDVet, ID Screen® BVD P80 Antigen Capture.

Los sistemas ELISA se basan en el uso de anticuerpos tanto monoclonales como policlonales para la detección de una diana específica. Dentro de los diferentes sistemas de ELISA desarrollados para la identificación del VDVB, encontramos

ensayos para la identificación de anticuerpos contra proteínas estructurales del virus y detección de antígenos del VDVB (Y. Wang & Pang, 2024). Los ELISA utilizados para la detección de anticuerpos se basan en proteínas del virus que pueden ser reconocidas por los anticuerpos presentes en el suero de los animales, por ejemplo, la proteína E2 (Behera et al., 2015; Nogarol et al., 2017) que ha sido catalogada como la proteína más inmunogénica del virus (Donis, 1995). Si bien los kits de ELISA de anticuerpos son capaces de detectar de manera eficaz la presencia de anticuerpos contra el virus, en el caso de los animales PI, que no presentan anticuerpos contra el VDVB, no pueden ser detectados por este método. Para detectar los animales PI mediante ELISA, este debe basarse en la detección de antígenos. Entre los antígenos investigados para su uso en los sistemas de ELISA se encuentran las proteínas Erns (Grego et al., 2007; Reza Seyfi Abad Shapouri et al., 2015; Vijayaraghavan et al., 2012) y E2 (Marzocca et al., 2007; X. Zhang et al., 2016), debido a que son las proteínas más inmunogénicas del virus (Chimeno Zoth & Taboga, 2006) y además en el caso de la proteína Erns una de las proteínas más conservada entre los distintos subgenotipos del virus (J. F. Ridpath, 2008) y en cual se basa el kit de detección comercial aprobado por el SAG, IDEXX, BVDV Ag/Serum Plus.

1.2 Anticuerpos monoclonales y su producción por técnica clásica de hibridomas

Los anticuerpos son glicoproteínas denominadas inmunoglobulinas, que representan el componente principal de la respuesta inmune humoral. Los anticuerpos están compuestos por cuatro polipéptidos, dos copias idénticas de las cadenas pesada (55 kDa) y ligera (25 kDa) que se mantienen unidas mediante enlaces disulfuro generando una molécula resultante que suele representarse esquemática en forma de Y con un tamaño aproximado de 150 kDa (Lipman et al., 2005). La cadena liviana está compuesta por un dominio variable (VL) y uno constante (CL), mientras que la cadena pesada tiene un dominio variable (VH) y tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3) (Prabakaran & Dimitrov, 2017). El reconocimiento del antígeno por parte de los anticuerpos es realizado por la región denominada “fragmento de unión a antígenos (Fab)”, que se compone de un dominio constante y otro variable de cada uno de los HC y LC (Figura 2). Dentro de la región Fab se encuentra el sitio de unión a antígenos, este sitio está compuesto por tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 del VL de la cadena liviana y CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 del VH de la cadena pesada (Chiu et al., 2019). Los anticuerpos son producidos por las células B y dependiendo el tipo de población celular pueden dividirse en 2 tipos: anticuerpos policlonales y monoclonales (Mitra & Tomar, 2021a). Debido a que los antígenos pueden presentar numerosos epítopos que son reconocidos por

un gran número de linfocitos la respuesta anticuerpo resultante es policlonal, pero, por el contrario, los monoclonales son producidos por una población homogénea correspondiente a un único clon de célula B (Lipman et al., 2005). Los anticuerpos monoclonales fueron reconocidos por primera vez en sueros de pacientes con mieloma múltiple, en los que la expansión clonal de células plasmáticas malignas produce altos niveles de un anticuerpo dando a lugar a una gammapatía monoclonal. A mediados de la década de 1970, Köhler y Milstein idearon una técnica para generar anticuerpos monoclonales de una especificidad deseada, (Köhler & Milstein, 1975), fusionando células B esplénicas con células de mieloma generando hibridomas inmortales productores de un anticuerpo único (anticuerpo monoclonal). Desde la publicación de la metodología para la producción de líneas productoras de anticuerpos estables mediante la generación de hibridomas (Köhler & Milstein, 1975), el uso de los anticuerpos monoclonales se ha hecho rutinario, tanto en los ámbitos de la investigación como en la clínica, dando paso al desarrollo de nuevas terapias (H Michael Shepard, 2017) y herramientas de diagnóstico basadas en anticuerpos monoclonales (J. P. Kim et al., 2023; R. Liu & Ko, 2023; Lütkecosmann et al., 2019; Qriouet et al., 2021). La producción de anticuerpos monoclonales por la técnica clásica de hibridomas tiene la ventaja de utilizar células B diferenciadas, y los anticuerpos monoclonales producidos por estas células ya han pasado por el proceso de maduración por afinidad (Nutt et al., 2015). Este es un proceso complejo de refinamiento en el cual se seleccionan

aquellos linfocitos que producen la inmunoglobulina de mayor afinidad y avidéz por un epítoto definido (Doria-Rose & Joyce, 2015). Este refinamiento es el resultado de la hipermutación somática de los genes de inmunoglobulina (Doria-Rose & Joyce, 2015). Además, cabe señalar que más del 90 % de los anticuerpos utilizados para diagnóstico o terapia aprobados por la Entidad Reguladora de Alimentos y Medicamentos de EE.UU. (*Food and Drug Administration*, FDA) tienen su origen en la tecnología de hibridomas (Mitra & Tomar, 2021b; Parray et al., 2020).

1.3 Anticuerpos IgY

Los anticuerpos IgY son inmunoglobulinas presentes en las aves, los reptiles y anfibios, y se consideran el precursor evolutivo de las IgG y las IgE presentes en los mamíferos (X. Zhang et al., 2017). La IgY está compuesta estructuralmente de manera similar a la IgG, teniendo 2 cadenas pesadas con un peso molecular aproximado de 67 a 70 kDa, y dos cadenas ligeras de 25 kDa. Las cadenas ligeras poseen una región constante y una región variable (CL y VL) de manera similar a la IgG. Las cadenas pesadas de la IgY están compuestas por cuatro regiones constantes (CH1-CH4) y una región variable (VH), en cambio las IgG posee tres regiones constantes en las cadenas pesadas (CH1-CH3) (Figura 2). Esta diferencia en la cantidad de las regiones constantes es la principal diferencia estructural entre las IgY e IgG confiriéndole

a la IgY un mayor peso molecular (180 kDa) en comparación con la IgG (150 kDa) (Michael et al., 2010).

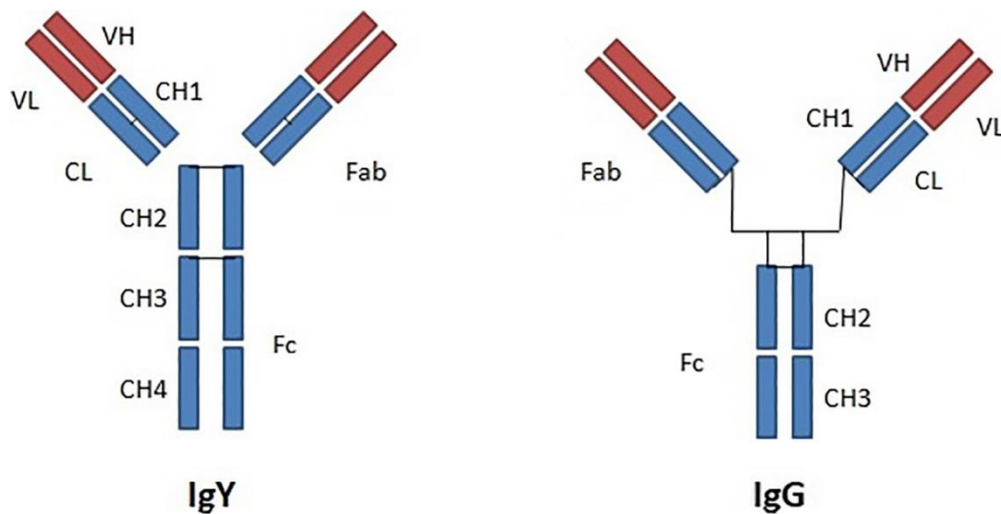


Figura 2. Representación esquemática de la estructura de los anticuerpos IgY e IgG. VL: Dominio variable de la cadena ligera; VH: Dominio variable de la cadena pesada; CL: Dominio constante de la cadena ligera; CH: Dominio constante de la cadena pesada; Fc: Fragmento cristalizante; Fab: Fragmento de unión a antígeno.

La búsqueda de nuevas fuentes de anticuerpos que faciliten el desarrollo de técnicas eficaces de menor costo, así como la reducción del uso de animales, ha incrementado el interés en los anticuerpos IgY. Las IgY se encuentran en la yema de huevo (Tesar et al., 2008) y pueden extraerse sin manipular al animal productor, pudiéndose obtener entre 100 y 150 mg de anticuerpos IgY por huevo (Pauly et al., 2009; Pereira et al., 2019). Considerando esto, en un periodo de un año, con la producción promedio de un huevo diario, se pueden obtener entre 20 y 40 g de IgY totales, de los cuales hasta un 10 % serían específicos contra

el antígeno deseado, lo que es considerablemente mayor que lo obtenido a partir de mamíferos (Huang & Ahn, 2019; Tini et al., 2002), como se puede observar al comparar la obtención de anticuerpos a partir de la yema de huevo y desde suero de conejo (Tabla 1).

Tabla 1. Comparación de la producción de anticuerpos IgG (conejo) e IgY

Animal	Conejo (IgG)	Gallina (IgY)
Fuente del anticuerpo	Suero	Yema de huevo
Tipo de inmunoglobulina	Policlonal	Policlonal
Toma de muestra	Sangrado	Colecta de huevos
Cantidad de anticuerpo	200 mg/sangrado (40 mL de sangre)	50-150 mg/huevo
Interacción con Receptor Fc	Si	No
Interacción con el factor reumatoide	Si	No
Activación del sistema complemento en mamíferos	Si	No

Modificado de (Pereira et al., 2019)

Los métodos de extracción de IgY se basan en la eliminación de lípidos para separar una fracción soluble en agua y precipitar los anticuerpos contenidos en esta fase soluble. Existen diferentes métodos para obtener IgY a partir de la yema de huevo y la elección del método adecuado depende del objetivo, así

como de la escala de extracción, el coste y el material disponible. Un método frecuentemente utilizado para la extracción de IgY es la precipitación con polietilenglicol (PEG) 6.000 (Polson et al., 1980). El método consiste en la delipidación de la yema de huevo y posterior precipitación de los anticuerpos IgY (Madera-contreras et al., 2022) obteniéndose finalmente una fracción concentrada de la IgY total, con una pureza entre el 80 al 90 % (Amro et al., 2018; Madera-contreras et al., 2022). Otra metodología utilizada es la precipitación con sulfato de amonio, donde se realiza una dilución de la yema a pH 5,0, y posteriormente se incuban con una solución de sulfato de amonio a distintas concentraciones lo que favorece la precipitación de las inmunoglobulinas .

Una ventaja relevante del uso de las IgY se encuentra la distancia evolutiva entre mamíferos y aves, lo que posibilita la generación de IgY específicas contra proteínas conservadas entre especies de mamíferos (Karlsson et al., 2004; Spillner et al., 2012). Otras ventajas de las IgY es que no activan el sistema complemento de los mamíferos (incluidos los humanos), no se unen a los receptores Fc de los mamíferos ni al factor reumatoide, que es uno de los principales causantes de falsos positivos en los inmunoensayos con muestras de suero en mamíferos (Dávalos-Pantoja et al., 2012; Gehin et al., 2021; Ghazal et al., 2021). Estas características han convertido a las IgY en un componente ideal como herramienta molecular en inmunoensayos diseñados para detectar moléculas en el suero sanguíneo humano (Carlander & Larsson, 2001; Kovacs-

Nolan & Mine, 2012; Larsson et al., 2022) y con potencial para ser utilizado en tratamientos de enfermedades infecciosas como el virus zika (Fink et al., 2017), la ascariosis (Lopes et al., 2020), rotavirus (Thu et al., 2017), y *Pseudomona aeruginosa* (Sanches et al., 2022). En cuanto a la utilización de IgYs en el desarrollo de inmunodiagnósticos, su aplicación se ha incrementado en los últimos años, utilizándose en dispositivos para la detección de coronavirus (COVID-19)(Porte et al., 2020), toxoplasmosis (Cakir-Koc et al., 2020), cáncer de próstata (Łupicka-Słowik et al., 2019), ascariasis (Jen et al., 2019), enfermedad de gumboro (Syahrani et al., 2021), *Vibrio parahaemolyticus* (Zhai et al., 2021) y la proteína E2 del VDVB (X. Zhang et al., 2016). Las características antes mencionadas: no unión a los receptores Fc y no activación del sistema complemento, han hecho que las IgY sean una alternativa a las terapias de inmunización pasiva. Además, la IgY administrada de manera oral es generalmente “reconocida como segura” (GRAS por sus siglas en inglés) por la FDA (Lee et al., 2021). Los anticuerpos IgY se han usado para el tratamiento de pacientes con infecciones de *Pseudomona aeruginosa* mediante lavados bucales (Nilsson et al., 2007) y también mediante la administración intranasal de IgYs contra este microorganismo en ratas, inhibiendo la pulmonía murina (Thomsen et al., 2021). Otro estudio demostró que la administración de anticuerpos IgY anti-SARS-CoV-2 en modelos de ratón tiene un efecto protector, sin generar efectos adversos al administrarse por vía intranasal (Fan et al., 2022).

Las características favorables, como la cantidad de IgY obtenida, una metodología de obtención amigable con los animales y un costo factible, junto con su lejanía filogenética respecto a los mamíferos y su potencial para reconocer regiones conservadas entre ellos, convierten a las IgY en una potente alternativa para el desarrollo de nuevos sistemas de detección y terapias basadas en el uso de estos anticuerpos (Abbas et al., 2019; Thirumalai et al., 2019).

1.4 Ensayos inmunocromatográficos de flujo lateral

Las técnicas de diagnóstico utilizadas actualmente son variadas y algunas de las más usadas por su sensibilidad y especificidad son las técnicas de ELISA y PCR. Estas técnicas si bien pueden ser específicas y sensibles necesitan de personal calificado para su manejo y de equipo e infraestructura especializada para su implementación. Además, requieren de horas para llevar a cabo el ensayo y obtener el resultado final (Soh et al., 2020).

La Organización mundial de salud (OMS) en el año 2003 introdujo el criterio ASSURED, el acrónimo de *Affordable, Sensitive, Specific, User-Friendly, Rapid and Robust, Equipment free, Environmentally friendly, Deliverable to end users* en inglés, lo que significa asequible, sensible, específico, fácil de usar, rápido y robusto, sin equipamiento, respetuoso con el medio ambiente y entregable a los usuarios finales (Ochwo et al., 2023) y el 2006, recomendó los criterios ASSURED como referencia para decidir si las pruebas de diagnóstico

responden a las necesidades de control de enfermedades (Peeling et al., 2006). Teniendo en cuenta los avances de la tecnología digital y la sanidad móvil la OMS agregó 2 nuevos conceptos *Real-time connectivity* y *Ease of specimen collection*, que son conectividad en tiempo real y fácil colecta de muestra naciendo así el criterio REASSURED (Land et al., 2019). Este criterio describe las características deseables de un sistema de diagnóstico y uno de los dispositivos que cumple este criterio son los dispositivos de flujo lateral (Otoo & Schlappi, 2022).

Dentro de los ensayos de flujo lateral se encuentran los ensayos inmunocromatográficos de flujo lateral (IFL) o tiras reactivas inmunocromatográficas. Estos ensayos se basan en una cromatografía en papel permitiendo la identificación de analitos mediante el uso de anticuerpos (Di Nardo et al., 2021) en un rango de tiempo entre 5-30 min (Koczula & Gallotta, 2016). El dispositivo de IFL se observa como una tira multicapa que se encuentra sobre un soporte de plástico (Sukumaran et al., 2021) (Figura 3). En un extremo se encuentra una almohadilla de celulosa denominada almohadilla de muestra que absorbe la muestra líquida y realiza un pretratamiento físico de la muestra. A continuación, se adhiere la almohadilla de conjugado, esta contiene el agente marcado que permitirá la detección del analito. Después, se coloca una membrana de nitrocelulosa en donde se imprimen los reactivos que formarán las líneas de prueba y de control. Esto permite evidenciar la detección

de la molécula objetivo y el correcto funcionamiento del ensayo, respectivamente (Bahadır & Sezgintürk, 2016).

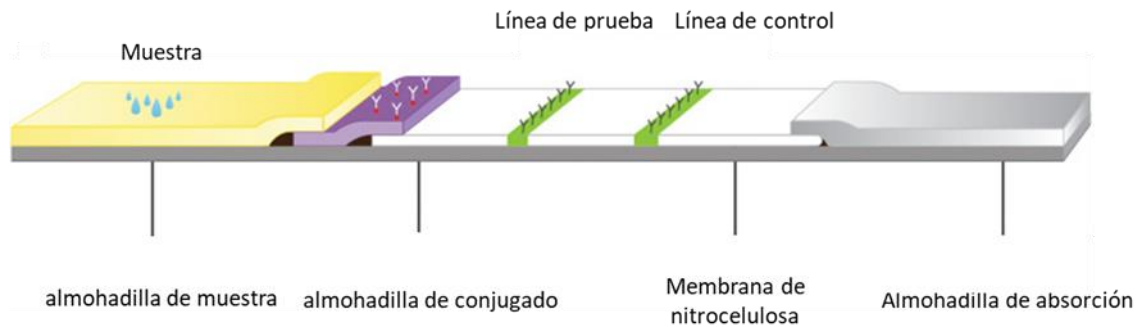


Figura 3. Esquema de dispositivo Inmunocromatográfico de Flujo Lateral. (modificado de Sukumaran et al., 2021)

Una de las ventajas de esta técnica es su capacidad para analizar un amplio espectro de matrices de muestra, tales como sangre, plasma, suero, orina, saliva, y líquido cefalorraquídeo. La versatilidad de los IFL ha propiciado su uso en diversos ámbitos, como la detección de microorganismos, las determinaciones serológicas, la detección de biomarcadores y de compuestos tóxicos en la industria de la agricultura y la alimentación (Chatterjee & Mukhopadhyay, 2022; Di Nardo et al., 2021). Existen dos formatos de IFL: el formato sándwich y el de competencia (P. Wang et al., 2024). En el formato sándwich, la molécula objetivo se captura entre dos anticuerpos complementarios: primero, se une a un anticuerpo marcado o conjugado y, luego, la molécula unida al anticuerpo marcado es captada por otro anticuerpo

fijado en la línea de prueba, denominado anticuerpo de captura (G. Li et al., 2023; Mirica et al., 2022). Este tipo de ensayo se utiliza normalmente para analitos con múltiples sitios antigénicos como son los casos del SARS-CoV-2 (G. Li, Wang, Chen, et al., 2021) y la Influenza aviar (G. Li, Wang, Li, et al., 2021). En la versión competitiva del IFL, el analito diana bloquea los sitios de unión del anticuerpo y se obtiene un resultado positivo si no se observa ninguna señal en la línea de prueba y un resultado negativo si aparece una línea coloreada en la línea de prueba. Los ensayos competitivos se utilizan para analitos más pequeños que tienen un único determinante antigénico, como fármacos y toxinas (Andryukov, 2020).

Las IFL han sido utilizadas como una herramienta inmunodiagnóstica y de inmunodetección debido a sus características y rápidos resultados, pero la sensibilidad de esta técnica es menor si se compara con otras técnicas que involucran un instrumento para su medición como lo es la técnica de ELISA (Y. Liu et al., 2021). Uno de los factores que más influye en la sensibilidad de la técnica de IFL son los agentes de detección conjugados a los anticuerpos, que hacen posible la detección y visualización del resultado. Los nanomateriales son los más utilizados como agentes de marcaje y, entre ellos, podemos encontrar nanopartículas de oro (AuNP), nanopartículas de carbono, partículas luminiscentes o quantum dots y nanopartículas magnéticas, cada una con sus características propias que las convierten en alternativas para ser utilizadas como agentes de marcaje (Mirica et al., 2022). Dentro de las alternativas que

se encuentran para el marcaje, las AuNP representan uno de los materiales más utilizados (Xu et al., 2016). Sus excelentes cualidades ópticas, su fácil metodología de producción, la posibilidad de producir nanopartículas de distintos tamaños y coloraciones han hecho de las AuNPs uno de los materiales predilectos en la producción de IFL, permitiendo obtener distintos límites de detección (Khlebtsov et al., 2019). El nanomaterial de oro más utilizado es la nanoesfera, reportándose niveles de detección del rango de ng/mL (Bahadır & Sezgintürk, 2016) como en dispositivos producidos para la detección de troponina 1 (0,1 ng/mL) (Mdluli et al., 2014), tuberculosis (5 ng/mL) (D. H. Choi et al., 2010), SARS-COV 2 (62.5 ng/mL) (G. Li, Wang, Chen, et al., 2021), antígeno carcinoembrionario (5 ng/mL) (Zeng et al., 2009) y fentanilo (1 ng/mL) (Z. Li et al., 2020). Se han desarrollado nuevos materiales de oro que pueden emplearse como agentes de marcaje. Entre las nuevas alternativas, encontramos las nanoflores de oro (He et al., 2023). Las nanoflores son nanopartículas de oro con una apariencia similar a una flor que presentan algunas ventajas sobre las nanoesferas, como una mayor adsorción de los anticuerpos (L. Zhang et al., 2015) y una fuerte intensidad de señal óptica bajo luz natural sin luz de excitación adicional (W. Zhang et al., 2019). Se ha demostrado que su uso aumenta la sensibilidad de la técnica IFL entre 5-10 veces en comparación a las nanoesferas (Lai et al., 2019; Taranova et al., 2021), pero tienen como desventajas un protocolo de síntesis más complicado que el de las nanoesferas, además de un difícil control del tamaño y la forma de

las partículas (He et al., 2023). Otro elemento que influye en la sensibilidad y la especificidad de la IFL es la selección de anticuerpos como agentes de captura/detección, ya que deben tener una cinética rápida y una alta afinidad de unión a la diana de interés, debido a que se dispone de un corto tiempo para la unión a la diana en la línea de prueba (Soh et al., 2020). También ejerce un efecto sobre la sensibilidad de la IFL el flujo de muestra determinando por el tipo de membrana (Harpaz et al., 2020), el cual puede modificar el tiempo de interacción entre los inmunocomponentes y los analitos presentes en la muestra.

Las características favorables de la IFL asociadas a al criterio ASSURED y la constante búsqueda de nuevas metodologías para aumentar su sensibilidad la hacen una fuerte alternativa como herramienta de diagnóstico e identificación.

2. HIPOTESIS

La hipótesis de este proyecto plantea que:

La proteína Erns del VDVB es detectada por un sistema inmunocromatográfico de flujo lateral mediante la combinación de anticuerpos monoclonales murinos y una preparación hiperinmune de anticuerpos IgY.

3. OBJETIVO

Para aceptar o refutar la hipótesis planteada, proponemos los siguientes objetivos de trabajo:

3.1 Objetivo General

Desarrollar un dispositivo inmunocromatográfico de flujo lateral prototipo, basado en la detección de la proteína Erns del VDVB.

3.2 Objetivos Específicos:

1. Obtener la proteína Erns recombinante del VDVB purificada.
2. Generar anticuerpos monoclonales y anticuerpos aviares IgY contra la proteína Erns, y anticuerpos IgY contra la IgG murina.
3. Generar prototipo de dispositivo inmunocromatográfico de flujo lateral para la detección de la proteína Erns.
4. Evaluar los rangos de detección del dispositivo prototipo frente a la proteína Erns.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

4.1.1 Cepas bacterianas

- *Escherichia coli*, cepa Top10 (Life Technologies: F– mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galUgalK λ – rpsL(StrR) endA1 nupG. Cepa bacteriana utilizada para la amplificación de plásmidos.

4.1.2 Medios de cultivo de bacterias

- Medio Luria Bertani (LB): 10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 10 g/L NaCl.
- Medio LB Agar: 10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 10 g/L NaCl, 15 g/L agar.
- Medio LB gentamicina: 10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 10 g/L NaCl, gentamicina a una concentración final de 25 μ g/mL.
- Medio LB Agar gentamicina: 10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 10 g/L NaCl, 15 g/L agar, gentamicina 25 μ g/mL.
- 2xYT: 16 g/L triptona, 10 g/L extracto de levadura, 5 g/L NaCl.
- 2xYT A-K-T-G: 16 g/L triptona, 10 g/L extracto de levadura, 5 g/L NaCl, ampicilina (A) (100 μ g/ml), kanamicina (K) (50 μ g/ml) y tetraciclina (T) (10 μ g/ μ l), gentamicina (7 μ g/mL)

- Medio LB Agar A-K-T-G X-Gal IPTG: 10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 10 g/L NaCl, 15 g/L agar, ampicilina (A) (100 µg/ml), kanamicina (K) (50 µg/ml), tetraciclina (T) (10 µg/ul), gentamicina (G) (7 ug/mL), X-gal (20 µg/µL) y IPTG (40 µg/µL).

4.1.3 Líneas celulares

- SF21 (Thermo Fischer): Línea celular de insecto derivada del tejido ovárico pupal de *Spodoptera frugiperda*. Las células son susceptibles a la infección por baculovirus y se utilizan en la producción de proteínas utilizando sistemas de vectores baculovirales.
- Sp2/0 (ATCC, CRL-1581): Línea celular de mieloma murino utilizada para la producción de hibridomas.

4.1.4 Reactivos y soluciones de cultivo celular

- Medio SF900ii (Thermo Fischer Scientific).
- Suero Fetal Bovino (Cytiva).
- Medio de congelación células SF21: Medio SF900 suplementado con 10% (v/v) de suero fetal y 10% (v/v) DMSO.
- CellFectin II Reagent (GIBCO)

- Tampón fosfato salino (PBS): NaCl 8 g/L (Merck), KCl 0.2 g/L (Merck), Na₂HPO₄ 1.44 g/L (Merck) y 0.245 g/L NaH₂PO₄, pH 7.4.
- Penicilina/Estreptomicina (10.000 U/ml) (Thermo Fischer Scientific).
- L-Glutamina GlutaMAX™ Supplement (Thermo Fischer Scientific).
- RPMI 1640 Hibri-Max™ (Sigma Aldrich)
- Suplemento de cultivo HAT Hibri-Max™ (Sigma Aldrich)
- Suplemento de cultivo HT Hibri-Max™ (Sigma Aldrich)
- Piruvato de sodio Hibri-Max™ (Sigma Aldrich)
- L-Glutamina Hibri-Max™ (Sigma Aldrich)

4.1.5 Reactivos y medios de cultivo para producción de Hibridomas

- Polietilenglicol (PEG) Hibri-Max™ (Sigma Aldrich)
- Medio de cultivo Hibridomas: RPMI 1640 Hibri-Max™ suplementado con suero al 20 %
- Medio de selección (Medio HAT): RPMI 1640 Hibri-Max™ suplementado con suero al 10 % y suplemento de cultivo HAT Hibri-Max™ a 1X
- Solución L-glutamina-Piruvato 100x: 3 g de Piruvato de sodio Hibri-Max™ y 1,1 g de L-glutamina Hibri-Max™ en 100 mL de agua destilada, luego filtrar por filtro de 0,22 µm.
- Medio congelación hibridomas: 90% suero suplementado con 10% de DMSO.
- Adjuvante completo de Freund (Sigma Aldrich).

- Adjuvante incompleto de Freund (Sigma Aldrich).
- Resina de proteína G (GeneScript)

4.1.6 Anticuerpos

- Anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a Alexa-Fluor 680 (Jackson Immuno Research).
- Anticuerpo monoclonal anti-Histidina (Biolegend)
- Anticuerpo anti-IgY conjugado a Alexa-Fluor 680 (Jackson Immuno Research).
- Anticuerpo anti-IgY HRP (Abcam)
- Anticuerpo anti- IgG ratón HRP (Abcam)
- Anticuerpo anti- IgG1 ratón HRP (Jackson Immuno Research).
- Anticuerpo anti- IgG2a ratón HRP (Invitrogen)
- Anticuerpo anti- IgG2b ratón HRP (Invitrogen)
- Anticuerpo anti- IgG3 ratón HRP (Invitrogen)
- Anticuerpo anti- IgA ratón HRP (Invitrogen)
- Anticuerpo anti- IgM ratón HRP (Invitrogen)

4.1.7 Soluciones para extracción y purificación de ADN plasmidial.

- Solución I: 50 mM Glucosa, 25 mM Tris-Cl pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8,0, 0,1 mg/ml RNasa A.
- Solución II: 0,2 M NaOH, 1 % (p/v) SDS.
- Solución III: 5 M Acetato de potasio, Ácido acético glacial.
- Cloroformo (Winkler).
- Isopropanol (Merck).
- Etanol absoluto (Merck).

4.1.8 Electroforesis de ADN.

- Tampón TAE: 40 mM Tris, 1 mM EDTA, 20 mM ácido acético.
- Tampón de carga ADN 6X: 30 % (v/v) Glicerol y 0,25 % (p/v) Azul de bromofenol.
- 1 % Bromuro de etidio en agua (Merck).
- Agarosa (Lonza).
- Marcador de peso molecular de ADN 1kb (New England BioLabs).

4.1.9 Soluciones para electroforesis de proteínas.

- 30 % (p/v) Acrilamida (Merck), 0,8 % (p/v) Bisacrilamida (Merck)
- 1,5 M Tris-HCl pH 8,8.
- 0,5 M Tris-HCl pH 6,8.
- 10 % (p/v) SDS.

- 10 % (p/v) Persulfato de amonio.
- TEMED (Merck).
- Tampón de corrida: 25 mM Tris, 192 mM Glicina, 0,1 % (p/v) SDS.
- Tampón de carga 6X con β -Mercaptoetanol (Condición denaturante y reductora): 10 % (p/v) SDS, 0,6 % (v/v) β -Mercaptoetanol, 0,012 % (p/v) azul de bromofenol, 0,35 M Tris, 30 % (v/v) glicerol
- Patrón de peso molecular AccuRuler RGB Plus (MaestroGen,)
- Solución de tinción Azul de Coomassie: 0,25 % (p/v) Azul de Coomassie brillante R250 (Merck), 10 % (v/v) ácido acético (Merck), 45 % (v/v) Metanol (Merck).
- Solución de destinción: 10% (v/v) metanol, 20% (v/v) ácido acético.

4.1.10 Soluciones para Western blot.

- Tampón de transferencia: 48 mM Tris, 39 mM Glicina 0,037 % (p/v) SDS, 20 % (v/v) Metanol.
- Tampón tris salino (TBS): 3,0 g/L Tris, 8,0 g/L NaCl, pH 7,6.
- Solución de bloqueo: 5 % (p/v) leche descremada en TBS.
- Tampón Lavado membrana: TBS con 0,1 % (v/v) Tween-20, 0,01 % (v/v) SDS.
- Membrana Nitrocelulosa, Amersham Protran 0,2 μ m, 300 mm x 4 m (GE Healthcare Life Science).

4.1.11 Materiales y soluciones para cromatografía de afinidad a iones metálicos.

- NiSO₄ (Merck, Alemania).
- Imidazol (Merck, Alemania).
- Sepharose Fast Flow (Cytiva).

4.1.12 Soluciones para Inmunoensayo de ELISA

- Tampón de recubrimiento: 2,93 g/L NaHCO₃, 1,52 g/L Na₂CO₃, pH 9,6.
- PBS: NaCl 8 g/L (Merck), KCl 0,2 g/L (Merck), Na₂HPO₄ 1,44 g/L (Merck) y 0,245 g/L NaH₂PO₄, pH 7,4.
- Tampón lavado: PBS con 0,05 % (v/v) Tween-20.
- Reactivo de revelado 1-Step™ Ultra TMB (Thermo Fisher Scientific)
- Solución de parada: Ácido sulfúrico 2,5 M.

4.1.13 Equipos.

- Agitador magnético con placa calefactora MSH-20A (Daihan Scientific Co.Ltd).
- Agitador Orbital SHO-1D (Daihan Scientific Co.Ltd.).
- Bloque térmico MaXtable H10-Set (Daihan Scientific Co.Ltd.).
- Cabina de Flujo Laminar AVC-4D1 (ESCO Technologies, Inc., Singapur).
- Centrífuga modelo 5702 (Eppendorf)
- Centrífuga refrigerada MIKRO 220R (Hettich Zentrifugen).

- Centrífuga Sorvall Legend Micro 21 (Thermo Fisher Scientific).
- Centrífuga Sorvall RC6 plus (Thermo Fisher Scientific).
- Lector de microplacas multimodo Synergy HTX (BioTek).
- Equipo de Trasferencia semi-húmeda Trans-Blot Turbo (Bio-Rad).
- Equipo foto-documentador Odyssey (LI-COR).
- Fuente de poder Bio-Rad Power Pac Basic (Bio-Rad)
- Incubador con ajuste de temperatura BJPX-Augusta (BIOBASE)
- Mezclador Vortex VM-10 (Daihan Scientific Co.Ltd.).
- Incubador con agitación orbital con ajuste de temperatura BJPX-Wichita (BIOBASE)
- Incubador de células AutoFlow 5510 (NuAire)
- Gabinete de bioseguridad clase 2 LABGARD (NuAire)
- Microscopio invertido de fluorescencia AE31 Elite (Motic)
- Sistema de Cromatografía ÄKTA Prime TM plus (GE Healthcare).
- Transiluminador UVITEC (Cambridge)
- Dispensador de muestra para impresión de tiras reactivas AUTOKUN HGS510 (Hangzhou Autokun Technology Co., Ltd).

4.2 Métodos

4.2.1 Técnicas generales de análisis y manipulación de ADN.

Electroforesis de ADN en gel de agarosa.

Se prepararon geles de agarosa al 0,8 % (p/v) en tampón TAE con bromuro de etidio a una concentración final de 200 ng/mL. A las muestras se les añadió tampón de carga, y fueron cargadas en el gel. Las corridas se realizaron a 100 V constantes por 30 min. Los geles fueron visualizados en transiluminador UV.

Purificación de ADN plasmídico a escala mini-preparativa.

Para la purificación del ADN a escala mini-preparativa se inocularon colonias individuales de bacterias transformadas con los plásmidos a utilizar en tubos con 5 mL de medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente y se incubaron a 37°C a 150 RPM de agitación durante 16 h. Los cultivos se centrifugaron a 8.000 g por 5 min, se descartó el sobrenadante y el precipitado de bacterias se resuspendió en 100 µL de solución I. Luego, se adicionó 100 µL de solución II, se mezcló por inversión y se incubó 5 min a 25°C. A cada muestra se le agregaron 100 µL de solución III, se mezcló por inversión y se incubó 15 min en hielo. Las muestras fueron centrifugadas a 12.000 g por 15 min y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Se añadió 240 µL de isopropanol, se mezcló por inversión y se centrifugó a 12.000 g por 15 min. El sobrenadante fue

aspirado y el precipitado se secó por 5 min a 25°C. La muestra de ADN se resuspendió en 20 µL de agua y la presencia de ADN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa.

Digestión analítica con enzimas de restricción.

Con el objetivo de corroborar la presencia del plásmido utilizado, se realizaron chequeos con enzimas de restricción. Para esto se prepararon reacciones en un volumen de 20 µL con 1 µg de ADN. La cantidad de enzima se determinó según los datos del fabricante donde se señala la cantidad de ADN que corta la enzima por UI, además del tampón correspondiente para su funcionamiento. Las reacciones de digestión se incubaron por 2 h a 37°C (o temperatura indicada por el fabricante). El resultado se analizó mediante electroforesis de ADN en gel de agarosa al 1 %.

Preparación de bacterias quimiocompetentes y transformación

Para la transformación de las cepas bacterianas se prepararon bacterias quimiocompetentes y se transformaron mediante *shock* térmico con el plásmido correspondiente.

Para la preparación de las bacterias quimiocompetentes se inoculó una colonia aislada de la cepa bacteriana a transformar en 5 mL de medio LB suplementado con antibiótico correspondiente, y se cultivó por toda la noche a 37°C. El inóculo se traspasó a un matraz con 300 mL de medio LB con el antibiótico necesario y

se cultivó en agitación hasta llegar a una densidad óptica (DO) de 0,6 a una longitud de onda de 600 nm. El cultivo se centrifugó a 4270 g por 15 min y el sobrenadante fue eliminado. El precipitado fue resuspendido en 300 mL de glicerol al 10 % v/v frío y se centrifugó a 4270 g por 15 min. Luego se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las bacterias en 150 mL de glicerol frío al 10 % v/v y se centrifugó a 4270 g por 15 min. Nuevamente se resuspendieron las bacterias esta vez en 10 mL de glicerol frío al 10% v/v y se centrifugó a 4270 g por 15 min. Finalmente, las bacterias se resuspendieron en 1,5 mL de glicerol frío al 10 % v/v y se prepararon alícuotas de 50 µL de las bacterias competentes.

Para la transformación, se añadió entre 50 y 100 ng de plásmido a la alícuota de bacterias quimiocompetentes y se incubó en hielo por 20 min. Se incubaron a 42°C por 1 minuto, y dejaron en hielo por 10 min. Luego se añadieron 450 µL de medio LB y se incubaron las bacterianas 1 h a 37°C. Finalmente, se realizó la siembra en medio LB agar suplementado con antibiótico correspondiente y se incubaron a 37°C por 16 h.

4.2.2 Técnicas generales de análisis y manipulación de proteínas.

Precipitación de muestras de proteínas con ácido tricloroacético.

La muestra de proteínas a precipitar se traspasó a un microtubo, se añadió 0,1 volumen de una solución al 0,15 % (p/v) de desoxicolato de sodio, se agitó con vórtex, y se incubó a 25°C por 10 min. Posteriormente, se añadió 0,1 volumen de 76 % (p/v) ácido tricloroacético a la muestra y se centrifugó a 12.000 g durante

15 min. Se eliminó el sobrenadante, se añadió un volumen de acetona fría y se centrifugó a 12.000 g durante 5 min. Se retiró el sobrenadante por aspiración y se dejó secar los tubos. Finalmente, se resuspendió la muestra en el volumen deseado de agua.

Preparación de geles de poliacrilamida.

Se prepararon geles denaturantes de poliacrilamida al 12 % de 1,0 mm de grosor para todos los análisis realizados. Los geles para electroforesis de proteínas se prepararon de la siguiente manera.

- **Gel Separador al 12,5%**

Agua (mL): 4

Acrilamida 30%-bisacrilamida 0,8% (mL): 4,8

Tris-HCl 1.5 M pH 8,0 (mL): 3

SDS 10% (µL): 120

PSA 10% (µL): 120

TEMED (µL): 12

- **Gel concentrador**

Agua (mL): 2,6

Acrilamida 30%/bisacrilamida 0.8% (mL): 1

Tris-HCl 0,5 M pH 6,5 (mL): 1,25

SDS 10% (µL): 50

PSA 10% (µL): 50

TEMED (µL): 10

4.2.3 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (PAGE).

Para la electroforesis de proteínas se añadió a las muestras tampón de carga 6X con β -mercaptoetanol y se incubó a 95°C por 5 min en placa térmica. Luego, las muestras y el patrón de peso se cargaron en los geles de poliacrilamida. Las corridas se realizaron a corriente constante de 100 V durante 70-90 min. A continuación, se tiñó el gel con Azul de Coomassie por 30 min en agitación para luego lavarlo con una solución de destinción. El resultado fue digitalizado utilizando el equipo ODYSSEY-C1x (LI-COR).

4.2.4 Western blot.

Al finalizar la electroforesis de proteínas, SDS-PAGE, se realizó la transferencia de las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa utilizando un equipo de transferencia semiseca (Trans-Blot® Turbo, BioRad), con un amperaje de 0,3A y un voltaje de 20V por 30 min. Una vez terminada la transferencia, se bloqueó la membrana con una solución de leche descremada al 5 % (p/v) en TBS durante 1 h en agitación a 25°C. Luego, la membrana se incubó con una solución de anticuerpo primario preparado en leche descremada al 5 % (p/v) en TBS, durante 2 h en agitación. La membrana se lavó 3 veces por 10 min con Tampón de lavado, y se incubó con el anticuerpo secundario conjugado a fluoróforo preparado en leche descremada al 5 % (p/v) en TBS. Tras una hora de incubación, la

membrana se lavó 3 veces y el resultado fue obtenido en el equipo ODYSSEY-Clx (LI-COR) para la detección de fluorescencia y se digitalizó utilizando el software Image Studio y el equipo LI-COR ODYSSEY-Clx.

4.2.5 ELISA indirecto

Para esto, se recubrieron placas Maxisorp (Nunc, Thermo) con 50 μ L de la proteína de 5 μ g/ml en tampón de recubrimiento y se incubó toda la noche a 4°C en cámara húmeda. La solución de recubrimiento fue eliminada, se realizaron 3 lavados con 200 μ L por pocillo con solución de lavado y se bloquearon los pocillos con 200 μ L de una solución al 3 % (p/v) de leche descremada en PBS durante 1 h a 37°C. A continuación, se eliminó la solución de bloqueo, y se añadieron las muestras preparadas en una solución al 1 % de Leche descremada en PBS-Tween 0,05 % y se incubó a 37°C por 2 h. Luego, se realizaron 3 lavados con tampón de lavado. Se añadió 100 μ L/pocillo de anticuerpo secundario conjugado a HRP y se incubó a 37°C por 1 h. Luego, se realizaron 3 lavados con PBS-Tween y se añadieron 100 μ L de la solución de revelado 1-Step™ Ultra TMB (Thermo Scientific). La reacción se detuvo por adición de 50 μ L de solución de parada y se realizó la lectura de la DO a 450 nm en el lector de microplacas multimodo Synergy HTX (BioTek).

4.3 Producción de y purificación de la proteína rErns

4.3.1 Generación de báculo Erns-NCP

Se identificó la secuencia para la proteína Erns del VDVB variante NCP desde la base de datos Uniprot (Q9JA06) y, además se le agregó a esta una etiqueta de histidina en el extremo C terminal para su posterior purificación e identificación y una secuencia de secreción en el extremo N terminal (secuencia de la proteína de 30 kDa del gusano de seda), para obtener la proteína desde el medio de cultivo y se insertó en sitio de multiclonamiento del vector pACEBac-1 y se denominó pACEBac Erns-NCP. Para la producción del báculo y posterior baculovirus se utilizó el sistema MultiBac de Geneva Biotech. Se transformaron las bacterias quimiocompetentes *E. coli* DH10EMBacY, agregando 100 ng del plásmido pACEBac Erns-NCP y se dejaron 30 min en hielo, luego se incubaron 2 min a 42°C y llevaron nuevamente al hielo por 10 min. Una vez pasado los 10 min se agregó 1 mL de medio de cultivo LB y se incubaron 1 h a 37 °C. Las bacterias transformadas se sembraron en placas agar-LB que contienen Ampicilina, Kanamicina, Tetraciclina, Gentamicina, X-gal e IPTG y se dejaron en incubación por 24 h a 37°C. La verificación de la inserción de la secuencia de interés desde el plásmido pACEBac Erns-NCP al báculo se confirma mediante la presencia de colonias de color blanco.

4.3.2 Cultivo celular en adhesión de células de insecto

Células de la línea celular de insecto SF21 se cultivaron en medio de cultivo SF900ii suplementado con antibióticos (penicilina/estreptomicina) y L- glutamina utilizando un incubador a 27°C.

4.3.3 Cultivo celular en suspensión de células de insecto

Células de la línea celular de insecto SF21 se cultivaron en matraces de vidrio en un incubador (BIOBASE, BJPX-Wichita) con una agitación de 130 RPM a una temperatura de 27°C utilizando el medio de cultivo SF900 suplementado con antibióticos (penicilina/estreptomicina) y L-glutamina.

4.3.4 Obtención del baculovirus Erns-NCP

Se sembraron 800.000 células SF21 por pocillo en una placa de 6 pocillos y se dejaron asentar 15 min a 25°C, luego se cambió el medio de cultivo a 2 mL medio sin suplementar (sin antibióticos ni suero). En tubos separados se preparó una solución con 8 µL del reactivo CellFectin II Reagent (GIBCO) con 100 µL de medio de cultivo sin suplementar y otro con 100 µL de medio de cultivo sin suplementar y el bácmido Erns-NCP. Ambos tubos se mezclaron y se les aplicó vórtex brevemente. La mezcla se dejó 30 min a 25°C. Luego se aplicó la mezcla al cultivo celular gota a gota y se incubó a 27°C por 5 h. Finalmente, el medio que contenía la mezcla de transfección se retiró y reemplazó por medio completo con 10 % de suero bovino fetal y se incubó por 72 h. La correcta transfección se

identificó mediante la presencia de fluorescencia. Finalmente, los medios de cultivo fueron colectados y centrifugados a 2000 RPM por 10 min para separar el medio de los restos celulares y fueron guardados a 4°C en protegidos de la luz. Estos medios corresponden al stock de baculovirus pase 0 (P0).

4.3.5 Selección baculovirus productores de la proteína rErns

Se sembraron 1 millón de células SF21 en placas de 6 pocillos con 1 mL de medio de cultivo sin suero y se agregaron 50 µL de medio de cultivo de las transfecciones realizadas con los bácmidos obtenidos y se cultivaron por 72 h a 27°C. Se tomó el medio de cultivo y se precipitó 1 mL con desoxicolato de sodio y se resuspendió en 100 µL de agua calidad biología molecular. Además, se realizó una extracción de proteínas de las células utilizando 100 µL del reactivo Pierce RIPA (Thermo Fischer Scientific). La identificación de la proteína rErns se realizó mediante el inmunoensayo de *Western blot*.

4.3.6 Inmunodetección por Western blot de la proteína rErns

Se realizó un SDS-PAGE utilizando geles de poliacrilamida al 12,5 % y se corrieron por 90 min a 100 V. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa utilizando el equipo de transferencia semiseca TransBlot turbo (Biorad). La membrana fue bloqueada en agitación, luego se incubó con el anticuerpo monoclonal anti-histidina en una dilución de 1/5.000 por 2 h a 25°C, y

posteriormente con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a Alexa flúor 680 (Jackson) por 1 h en agitación a 25°C. Finalmente, se escaneo utilizando el equipo Oddisey CLX (LI-COR).

4.3.7 Amplificación del baculovirus Erns-NCP

Cultivos en suspensión de 50 mL de cultivo de células SF21 a una densidad de 1 millón de células/mL se infectaron con 200 µL del P0 y se incubaron por 72 h. Luego, el medio se separó de las células centrifugando a 600 g por 10 min. Los medios de cultivo que contienen los baculovirus fueron guardados a 4°C protegidos de la luz. Estos medios de cultivo con los baculovirus amplificados corresponden a el stock P1.

4.3.8 Titulación del baculovirus por unidades formadoras de color

Se sembraron 50.000 células por pocillo en placa de 96 pocillos en 100 µL de medio de cultivo SF900 y se esperó 1 h a que las células se adhirieran a la placa. Se preparó una dilución de las muestras virales 1/40 (5 µL en 195 µL de medio de cultivo). Se preparo una placa auxiliar de 96 pocillos con 160 µL de medio por pocillo y se sembraron 40 µL de la dilución previa 1/40 en cada pocillo de la primera columna de la placa auxiliar. Luego se resuspendió con micropipeta y se pasó 40 µL a la columna 2 y así sucesivamente hasta la columna 12 cambiando las puntas cada vez que se pasó a la siguiente columna. Se tomaron 40 µL de

las diluciones de la placa auxiliar empezando por la comuna 12 y se agregó cuidadosamente a la placa con las células y siguió con la siguiente columna hasta llegar a la columna número 1. Se incubó la placa por 72 h para visualizar la presencia de células fluorescentes.

Se contaron las células fluorescentes en los pocillos de mayor dilución y el título viral se expresó como células fluorescentes $\times 5^{\text{n}^\circ \text{ de columna}}$ $\times 1000$ unidades formadoras de color (UFC)/mL.

4.3.9 Producción proteína rErns

Se cultivaron células SF21 con medio SF900 suplementado con antibióticos penicilina/estreptomicina y L-glutamina con agitación de 130 RPM (BIOBASE, BJPX-Whichita) a 27°C en matraces de vidrio hasta obtener cultivos de 400 mL a una densidad de 1 millón de células por mL y se infectaron con 0,1 UFC/célula. Las células infectadas se dejaron en cultivo por 120 h. Los medios de cultivo fueron separados de las células centrifugándolos a 4190 g por 10 min.

4.3.10 Purificación proteína rErns desde medio de cultivo

Al medio de cultivo que contiene la proteína rErns se le agregó tampón fosfato 1M pH 6,4 a una concentración final en solución de 50 mM, NaCl a una concentración en solución de 300 mM e imidazol para una concentración final de 25 mM. Para la purificación se utilizó la matriz Sepharose 6 Fast Flow (Cytiva)

acoplada al equipo de purificación AKTA Prime™ plus. La matriz fue cargada con níquel utilizando una solución de sulfato de níquel 0,2 M y equilibrada utilizando una solución de tampón fosfato 50 mM pH 6,4 y 25 mM de imidazol. La muestra se pasó a un flujo de 1 mL/min. La elución de las proteínas se realizó utilizando soluciones de 50, 100, 200 y 400 mM de imidazol en el mismo tampón fosfato. Se precipitaron las proteínas de 1 mL de las distintas eluciones utilizando desoxicolato de sodio y se resuspendieron en 100 µL de agua calidad biología molecular. La presencia de la proteína rErns en las distintas fracciones se evaluó por *Western blot*.

4.4 Generación de anticuerpos monoclonales anti-Erns

4.4.1 Cultivo de línea celular Sp2/0

Células de la línea celular Sp2/0 se cultivaron en medio de cultivo RPMI con 10 % de suero fetal bovino suplementado con antibióticos (penicilina/estreptomicina) y una solución de L-glutamina (0,11 mg/mL) y piruvato de sodio (0,3 mg/mL) en un incubador a 37°C con una atmosfera de CO₂ del 5% y humedad del 95%.

4.4.2 Inmunización de ratones con la proteína rErns

Se inmunizaron 5 ratones BALB/c de 4 semanas de vida por vía subcutánea con 20 µg de la proteína rErns purificada, adyuvados con el adyuvante completo de Freund (Sigma Aldrich) en una relación 50/50 en un volumen total de 200 µL. Se

realizaron 2 refuerzos a los días 14 y 28 post inmunización administrando 20 ug de proteína adyuvados con el adyuvante incompleto de Freund (Sigma Aldrich) en una relación 50/50. Al día 35 se extrajo sangre para verificación de la presencia de anticuerpos contra la proteína rErns en el suero de los animales inmunizados mediante ELISA indirecto.

4.4.3 Producción de hibridomas mediante fusión por polietilenglicol (PEG)

Tres días antes de la fusión, se realizó una inmunización de refuerzo a los ratones con 20 µg de rErns en PBS en 100 µL de volumen total por la vena de la cola. Posteriormente, los ratones se eutanasiaron y se les extrajo el bazo. Al bazo se le realizaron piquetes con una aguja y se perfundió con 10 mL de medio de cultivo RPMI repitiéndose 3 veces. El medio de la perfusión fue colectado y centrifugado a 300 g por 10 min y se guardó el sobrenadante como control positivo de anticuerpos para análisis posteriores. Las células obtenidas desde el bazo se resuspendieron en 10 mL de medio RPMI sin suero y sin antibióticos y se contaron utilizando una cámara de Neubauer, luego se les agregó un número de células de la línea Sp2/0 de manera tal que haya 1 célula Sp2/0 por cada 10 linfocitos. Las células se centrifugaron a 300 g por 10 min descartando el máximo de sobrenadante posible. El precipitado celular se soltó del tubo mediante golpes suaves y el tubo se colocó en agua a 37°C y se agregó 1 mL de solución de PEG HybriMax (Sigma Aldrich) gota a gota. Las células se centrifugaron a 100 g por 5 min y luego se les agregó 20 mL de medio de cultivo RPMI sin suero, se agitó

suevamente el tubo y se le agregaron 20 mL de medio de cultivo suplementado con 20 % de suero fetal bovino y se centrifugaron las células a 100 g por 5 min. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 10 mL de medio de cultivo suplementado con 10 % de suero fetal bovino y HAT 1X (medio HAT) y se dejó reposar por 15 min a 37°C. Finalmente, se completó el volumen a 100 mL y se sembraron 100 µL por pocillo en 10 placas de 96 pocillos y se incubaron a 37°C con una atmosfera de CO₂ del 5% y humedad del 95% evaluando su crecimiento diariamente.

4.4.4 Selección de hibridomas productores de anticuerpos

Se extrajo el medio de cultivo desde las placas de 96 pocillos con los cultivos de las células de hibridoma que tuvieran una confluencia mayor al 70% y se determinó la presencia de anticuerpos contra la proteína Erns mediante ELISA indirecto. Para esto se utilizó como fuente de anticuerpos primarios el sobrenadante de cultivo y como anticuerpo secundario el anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a HRP a una dilución de 1/10.000. Las células cuyo sobrenadante de cultivo analizado dieron como resultado una DO a 450 nm mayor a 1 se sembraron en placas de 24 pocillos. Una vez el cultivo llegó a un 70% de confluencia se volvió a analizar la presencia de anticuerpos anti-Erns mediante ELISA indirecto. Los hibridomas con absorbancia mayor a 1 en la prueba de ELISA fueron seleccionados y congelados.

4.4.5 Selección de clones productores de anticuerpos

Se realizaron cultivos por dilución limitante de los hibridomas productores de anticuerpos contra la proteína rErns seleccionados, dejando una célula por pocillo en placas de 96 pocillos. Una vez alcanzado una confluencia del 70 %, se retiró el medio de cultivo y se evaluó la presencia de anticuerpos anti-Erns en el medio mediante ELISA indirecto. Los clones cuyo medio de cultivo obtuvieron una DO a 450 nm mayor a 1 se seleccionaron y se sembraron en placa de 24 pocillos. Los medios de cultivo de los clones en placa de 24 pocillos se volvieron a analizar para verificar la presencia de anticuerpos anti-Erns en el medio de cultivo mediante ELISA indirecto. Los clones cuyo medio de cultivo analizado tuvieron una DO a 450 nm mayor a 1 fueron seleccionados y congelados.

4.4.6 Determinación de subclase de anticuerpos

La determinación de subclase de los anticuerpos se realizó mediante ELISA indirecto desde los sobrenadantes de cultivo de los clones productores de anticuerpos anti-rErns seleccionados. Se utilizó como anticuerpos secundarios los siguientes anticuerpos: anti-IgG total (Abcam) 1/20.000, IgG1 (Jackson laboratories) 1/10.000, IgG2a (Invitrogen) 1/2.000, IgG2b (Invitrogen) 1/2.000, IgA (Invitrogen) 1/2.000 e IgM (Invitrogen) 1/2.000. El ELISA fue revelado y se realizó la lectura de la DO a 450 nm en el equipo lector de microplacas multimodo Synergy HTX.

4.4.7 Determinación de K_D mediante ELISA indirecto

Para realizar una estimación de las K_D de los anticuerpos monoclonales obtenidos se usó el método descrito por Beatty (Beatty, Beatty, & Vlahos, 1987) para la determinación de K_D mediante ELISA. Para esto, se recubrieron placas Maxisorp (Nunc, Thermo) con 50 μ L de la proteína rErns a concentración de 2,5 y 1,25 μ g/ml en tampón de recubrimiento y se incubó toda la noche a 4°C en cámara húmeda. A continuación, se eliminó la solución de bloqueo, y se añadieron muestras de diluciones seriadas 1:2 de los anticuerpos monoclonales obtenidos desde los hibridomas F5C4, F5D9, F2D11 y H7C5 entre 40 nM y 4,8 μ M (100 μ L/pocillo) y Se incubaron a 37°C por 2 h. Luego, se añadió 100 μ L/pocillo de anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a HRP a dilución 1:20.000 y se incubó a 37°C por 1 h. Se agregó el reactivo de revelado y se realizó la lectura de DO a 450 nm. Los resultados se graficaron con el programa GraphPad Prism, para determinar las concentraciones de anticuerpo en el valor medio de DO registrado (DO50). Finalmente, se aplicó la siguiente fórmula matemática para el cálculo de K_D , donde $[Ab]$ es la concentración de anticuerpo a DO50 determinada con la concentración mayor de diana en el recubrimiento y $[Ab']$ es la concentración de anticuerpo a DO50 con la mitad de la concentración de diana en el recubrimiento:

$$K_D = 2x(2 [Ab'] - [Ab])$$

4.4.8 Purificación de anticuerpos monoclonales

La purificación se realizó según las indicaciones del fabricante de la resina de proteína G (Protein G Resin, GeneScript) La muestra que contiene las inmunoglobulinas se diluyó al 1:1 con tampón de unión/lavado. La resina se equilibró con tampón de unión/lavado (20 mM Na₂HPO₄, 0,15 M NaCl, pH 7) volumen equivalente a 5 veces el volumen de la resina. La muestra se aplicó en la columna y se pasó por gravedad. Luego se lavó la columna con 30 ml de tampón de unión/lavado.

Las inmunoglobulinas se eluyeron con 20 ml de tampón de elución (0,1 M glicina, pH 2.5 y se neutralizó inmediatamente con 1/10 del volumen del eluido total de tampón de neutralización (1 M Tris-HCl, pH 8,5).

4.5 Producción de anticuerpos policlonales IgY contra la proteína Erns e IgG murina

4.5.1 Inmunización de gallinas

Gallinas de la raza Lenhorn de 4 semanas fueron inmunizadas por vía intramuscular con 50 µg de la proteína rErns purificada adyuvados con el Adyuvante completo de Freund (Sigma Aldrich) en una relación 50/50 en un volumen total de 1mL. Se realizaron 2 refuerzos a los días 14 y 28 post

inmunización administrando 50 µg de proteína adyuvados con el adyuvante incompleto de Freund (Sigma Aldrich) en una relación 50/50. Se tomaron los huevos semanalmente a partir de la segunda inmunización.

4.5.2 Extracción de IgY desde yema de huevo

La cáscara de los huevos fue cuidadosamente agrietada y se separó la yema de la clara del huevo eliminando la mayor cantidad de clara posible. La yema se transfirió a un papel filtro y se rodó para eliminar los restos de clara. Luego se rompió la membrana de la yema para liberar su contenido en un tubo de 50 mL y se le agregó el doble del volumen colectado de la yema de PBS. A la mezcla de yema con PBS se le agregó PEG 6000 a una concentración de 3,5 % p/v y se incubó en agitación por 10 min a 25°C. Los tubos se centrifugaron por 20 min a 4°C a una velocidad de 17000 g. El sobrenadante se vertió a través de un filtro de pliegues en un nuevo tubo de 50 mL y se le agregó PEG 6000 a una concentración de 8,5 % p/v se mezcló por vortex y se dejó incubando en agitación por 10 min a 25°C. Posteriormente, se centrifugó a 17000 g por 20 min a 4°C. El sobrenadante obtenido se descartó y el precipitado se resuspendió en 10 mL de PBS, luego se le agregó PEG 6000 al 12 % p/v, se mezcló por vórtex y se incubó en agitación por 10 min. Los tubos se centrifugaron a 17000 g por 20 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. El precipitado obtenido se resuspendió en 2 mL de PBS aplicando vórtex y se dializó toda la noche en 2 L de una solución de

NaCl 0,1 M y luego por 3 h en 2 L de PBS. Las muestras se almacenaron a -20 °C.

4.6 Elaboración y ensamblaje de ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral

4.6.1 Producción de nanopartículas de oro de 40 nm

Las nanopartículas de oro se prepararon a partir de una solución de HAuCl₄ trihidrato (Santa Cruz) al 0,01 % y se calentó hasta ebullición, luego se agregó 500 µL de una solución de citrato trisódico al 1 % y se volvió nuevamente a ebullicir por 30 segundos. Para confirmar la producción de las nanopartículas del tamaño de 40 nm se realizó un espectro de absorbancia entre 400-700 nm en el lector de microplacas multimodo Synergy HTX (Biotek). El pico de absorbancia para partículas de 40 nm debe ser 530 nm. La presencia, tamaño y morfología de las partículas se evaluaron por microscopia electrónica utilizando el microscopio JEOL/JEM 1200 EX II.

4.6.2 Determinación de la cantidad mínima de anticuerpos a conjugar con nanopartículas de oro

En tubos de 1,5 mL se agregaron 100 µl de una solución que contenía entre 0 y 8 µg de anticuerpo y se les agregó 500 µl de la solución de nanopartículas de oro

pH 6-7 y se dejó 10 min a 25°C. Después se agregaron 500 µL de NaCl 10 % p/v a cada tubo con agitación y se realizó un escaneo espectral de las muestras entre 400-700 nm. Los tubos en los que no se produce un precipitado negro azulado y no se afecta el pico de absorbancia a 530 nm son los que tienen la cantidad mínima de proteína para estabilizar 0,5 mL de la solución de nanopartículas de oro producidas.

4.6.3 Optimización del pH de trabajo para la conjugación de anticuerpos con nanopartículas de oro

En tubos de 1,5 mL se agregaron 100 µL de una solución que contenía la concentración mínima para la obtener una conjugación estable previamente determinada y se les agregó 500 µL de la solución de nanopartículas de oro a distintos pH y se dejó 10 min a 25°C. Después, se agregaron 500 µL de NaCl 10 % p/v a cada tubo con agitación y se realizó un escaneo espectral de las muestras entre 400-700 nm. Los tubos en los que no se produce un precipitado negro azulado son los que poseen un pH que permite generar un conjugado estable de una solución de 500 uL de nanopartículas con la cantidad mínima de anticuerpo determinada.

4.6.4 Conjugación de anticuerpos con nanopartículas de oro

A un volumen de 20 mL de nanopartículas de oro pH 8 ajustado con una solución de carbonato de potasio K_2CO_3 0,2 M, se le agregó la cantidad necesaria previamente calculada de anticuerpos en tampón fosfato 10 mM ajustada a 20 mL. Se incubó por 15 min en agitación suave a 25°C. Luego se le agregaron 4 mL de la solución de bloqueo que corresponde a tampón borato pH 9 con BSA 10 % p/v y se incubó por 30 min en agitación suave a 25°C. La solución se centrifugó a 15.000 g, 4°C, se descartó el sobrenadante con cuidado de no tomar las nanopartículas y se resuspendió en 8 mL de tampón borato 50 mM pH 9, BSA 1% y trehalosa 5 % p/v.

4.6.5 Confección de tiras reactivas

Se activó la membrana de nitrocelulosa (FF120HP, Cytiva) con una solución de acetonitrilo 15 % y se dejó secar por 5 min a 25°C, luego se lavó la membrana con agua destilada y se dejó secar por 30 min a 37°C. Se imprimió la membrana en el equipo AUTOKUN HGS510 con las soluciones de anticuerpos correspondientes en la línea *test* y de control a 1 μ L/cm y se dejó secar a 37°C por 2 h. Luego la membrana se bloqueó utilizando una solución de fosfato 10 mM pH 7,4, BSA 2 % y Tween-20 0,1 % por 10 min y se secó por 1 h a 37°C. Se añadió a la almohadilla de conjugado (Standar sample pad 14, Cytiva) de 7 mm de ancho la solución de anticuerpos marcado con oro y se dejó secar a 37°C por

2 h. Paralelamente se bloqueó la almohadilla de muestra (MF1, Cytiva) de 1,7 cm de ancho con una solución de fosfato 10 mM pH 7.4, BSA 2 % y tween-20 0,1 %, EDTA 10 mM y se dejó secar a 37°C por 2 h. Además, la membrana de nitrocelulosa fue lavada con una solución de fosfato 10 mM pH 7,4, tween-20 0,1 % y se dejó secar por 2 h a 37°C. Finalmente se realizó el ensamblaje de la tira colocando los componentes: almohadilla de muestra, almohadilla de conjugado, membrana nitrocelulosa y la almohadilla de absorción (CF5, Cytiva).

5. RESULTADOS

5.1 Generación de baculovirus para la expresión de la proteína rErns

La secuencia de la proteína Erns del VDVB variante NCP, modificada con la adición de una etiqueta de histidina y secuencia de secreción, se insertó en el sitio de multiclonamiento del vector pACEBac-1 generando el plásmido denominado pACEBac-1 Erns-NCP. Mediante el sistema MultiBac (Geneva Biotech), se generó el bÁcmido necesario para la producción del baculovirus para la expresión de la proteína Erns del VDVB. Se seleccionaron 5 colonias de las bacterias transformadas con el plásmido pACEBac-1 Erns-NCP B2, B3, B4, B5 y B6, que fueron cultivadas y de las que se extrajo el bÁcmido generado. Con los bÁcmidos obtenidos se transfectaron células SF21 y se observó fluorescencia en las células a las 72 h de cultivo (Figura 4). La presencia de fluorescencia indicó la transfección de los bÁcmidos, debido a que la cepa *E. coli* DH10EMBacY tiene integrada la secuencia para la expresión de la proteína fluorescente amarilla, lo que facilita la evaluación de la infección. La generación de baculovirus y su potencial para expresar la proteína de interés se evaluó mediante *Western blot*. La presencia de la proteína rErns, tanto en el medio de cultivo como en los lisados celulares fue evaluada después de 72 h de infección con los baculovirus generados (Figura 5). El baculovirus B6 expresó la proteína recombinante de interés, lo que se corroboró al identificar, mediante un *Western blot*, una banda

entre 35 y 48 kDa en la mezcla de proteínas extraídas de los lisados celulares utilizando un anticuerpo monoclonal anti-histidina.

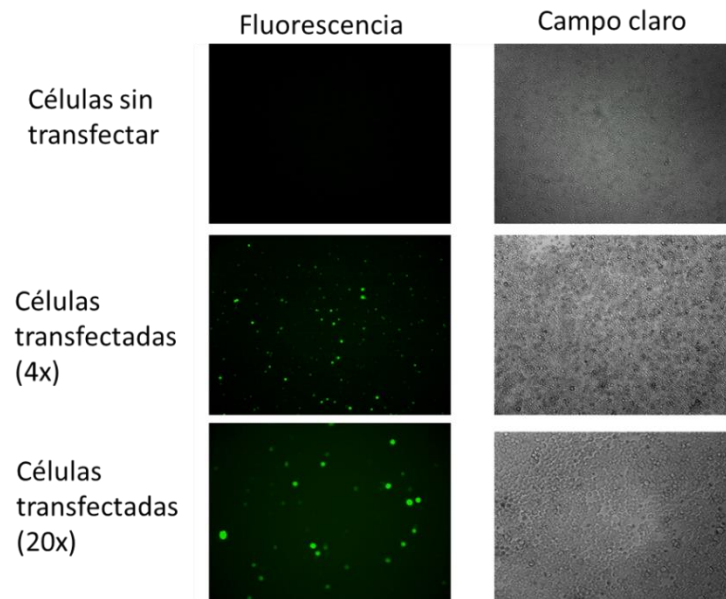


Figura 4. Análisis de señal fluorescente en células transfectadas con el báculo Erns-NCP. Evaluación de presencia de marcador fluorescente a las 72 h post transfección de células SF21 transfectadas con el báculo Erns-NCP.

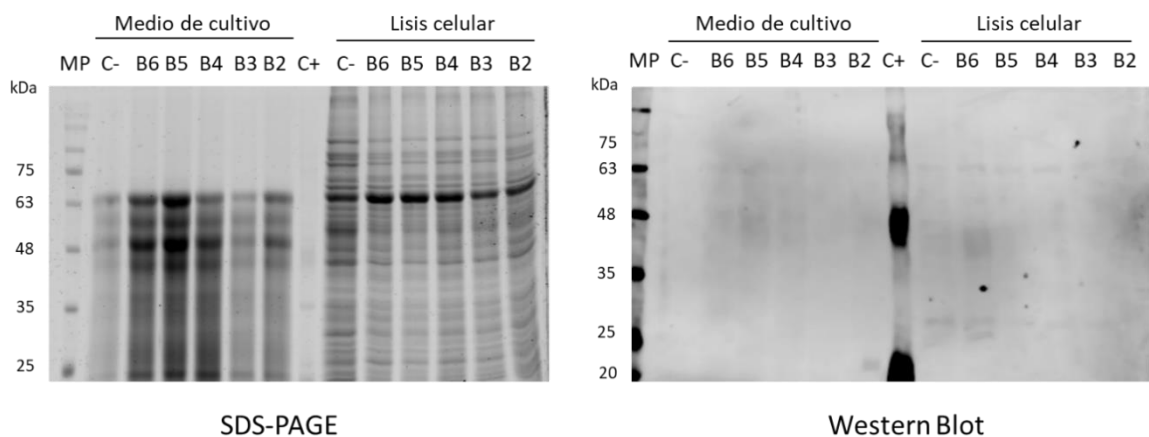
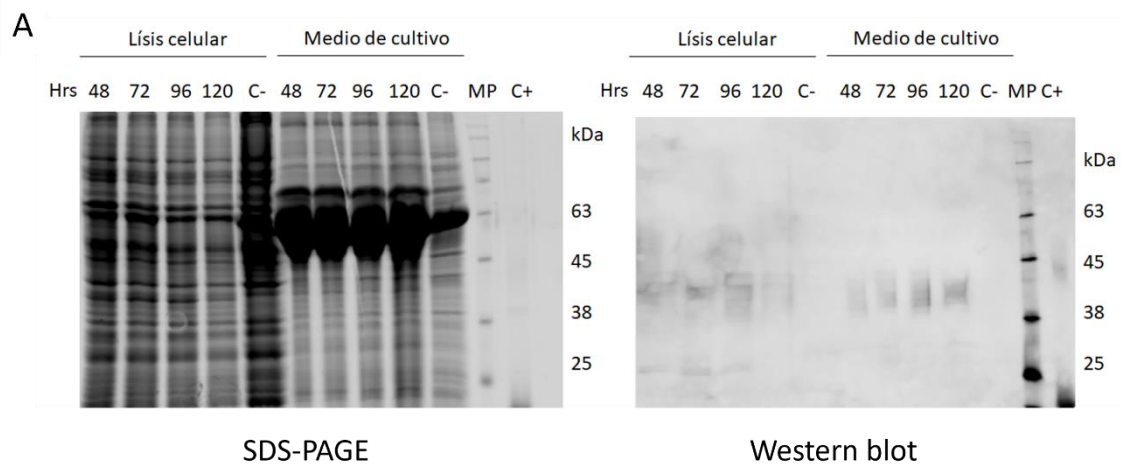


Figura 5. Expresión de la proteína rErns en células SF21 transducidas con los baculovirus generados. Análisis de la presencia de la proteína rErns, tanto en medio de cultivo como en la lisis celular de cultivos infectados con baculovirus generados con diferentes báculos (B2-B6). (C-): Cultivo sin infectar. (C+): Proteína con etiqueta de histidina MP: Marcador de peso molecular.

5.2 Producción de la proteína rErns

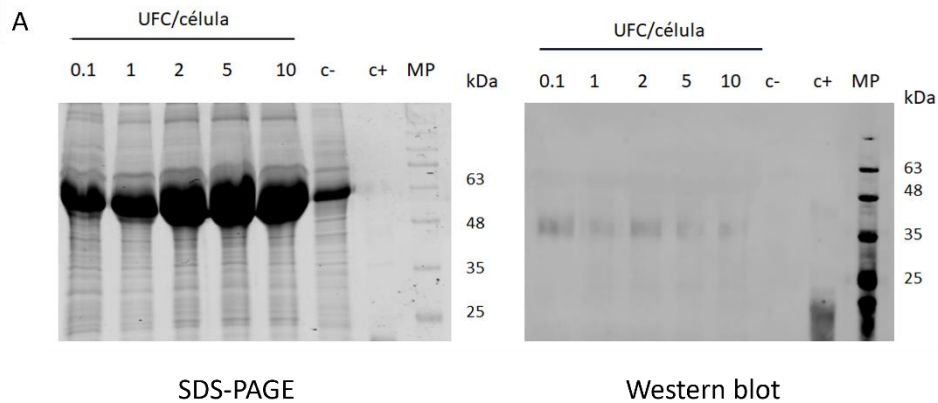
Para establecer las condiciones de producción de la proteína rErns, primero se probaron distintos tiempos de inducción. Los tiempos evaluados fueron 48, 72, 96 y 120 h utilizando un MOI de 1 unidades formadoras de color (UFC)/célula. La intensidad de la banda correspondiente a la proteína rErns aumentó en el tiempo observándose cualitativamente incrementada a las 96 y 120 h de inducción (Figura 6). En cambio, en las proteínas extraídas desde el lisado celular, la intensidad de la banda disminuyó a partir de las 120 h de cultivo. Con estos resultados, concluimos que el tiempo óptimo para la expresión de la proteína Erns recombinante es entre las 96 y 120 h. Posteriormente, se evaluó la cantidad de baculovirus a utilizar. Para ello, se realizó un nuevo cultivo en placas de 6 pocillos sembradas con 1×10^6 de células y se infectaron con un MOI de 0.1, 1, 2, 5 y 10 UFC/célula manteniendo un máximo de 120 h de cultivo. Se observó una mayor intensidad de las bandas correspondientes a la proteína Erns utilizando entre 0,1-2 UFC/célula (Figura 7). Con los resultados obtenidos se establecieron las condiciones para la producción de la proteína rErns en el medio de cultivo utilizando 0,1 UFC/célula durante un tiempo de inducción de 120 h.



B

Densitometría	
Tiempo	Señal banda Medio de cultivo
48 horas	394
72 horas	1050
96 horas	2000
120 horas	2850

Figura 6. Expresión de la proteína rErns a distintos tiempos de cultivo. A) Análisis mediante Western blot de la de la proteína rErns expresada en el medio de cultivo y en el lisado celular a distintos tiempos de inducción. B) Análisis densitométrico de las bandas correspondiente a la rErns en medio de cultivo. MP: Marcador de peso molecular. (C-): Medio de cultivo de células sin infectar. (C+): Proteína con etiqueta de histidina como control de anticuerpos anti-histidina.



B

Densitometría	
UFC/célula	Señal banda
0.1	1030
1	359
2	627
5	303
10	340

Figura 7. Expresión de la proteína rErns en el medio de cultivo con distintas concentraciones de infección. A): Evaluación por *Western blot* de la expresión de rErns en medio de cultivo a concentraciones crecientes de baculovirus por célula en inducciones de 120 h. B): Análisis densitométrico de las bandas correspondiente a la rErns en medio de cultivo. MP: Marcador de peso. (C-): Medio de cultivo de células sin infectar. (C+): Proteína con etiqueta de histidina como control de anticuerpos anti-histidina.

5.3 Purificación de la proteína rErns

La proteína rErns se purificó desde el medio de cultivo mediante una cromatografía de afinidad a iones metálicos (IMAC). Al medio de cultivo que contiene la proteína se le añadió una solución tampón de fosfato 50 mM pH 6,4 NaCl 300 mM e imidazol 25 mM para que tuviera las mismas condiciones que el tampón de equilibrio de la matriz. La purificación se realizó en la matriz *Sepharose Fast Flow* previamente cargada con níquel, y la elusión se realizó con

imidazol, favoreciendo la competencia por la unión del níquel y la liberación la proteína unida por la etiqueta de histidina. En este ensayo se determinó que la Erns recombinante eluye, mayoritariamente, desde los 250 mM de imidazol (Figura 8). Por tanto, definimos el proceso de lavado en tampón de 150 mM de imidazol y la elusión con una solución de 400 mM de imidazol. Después, la fracción eluída se concentró 10 veces utilizando el reactivo PEG 30000 para finalmente dializarla en PBS. Las muestras concentradas y dializadas se obtuvieron con una concentración de 300 ng/uL y una pureza superior al 80%. (Figura 9).

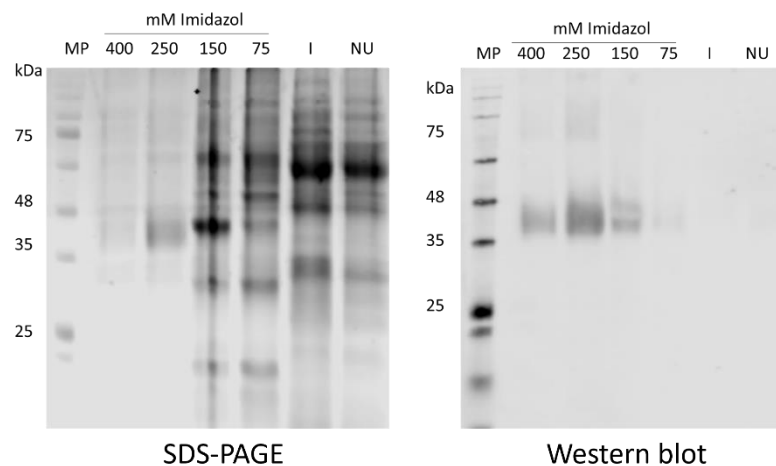


Figura 8. Purificación de la proteína rErns desde el medio de cultivo por IMAC. Evaluación de las fracciones eluídas a diferentes concentraciones de imidazol mediante *Western blot*. MP: Marcador de peso. I: Inicial o muestra de entrada. NU: No unido

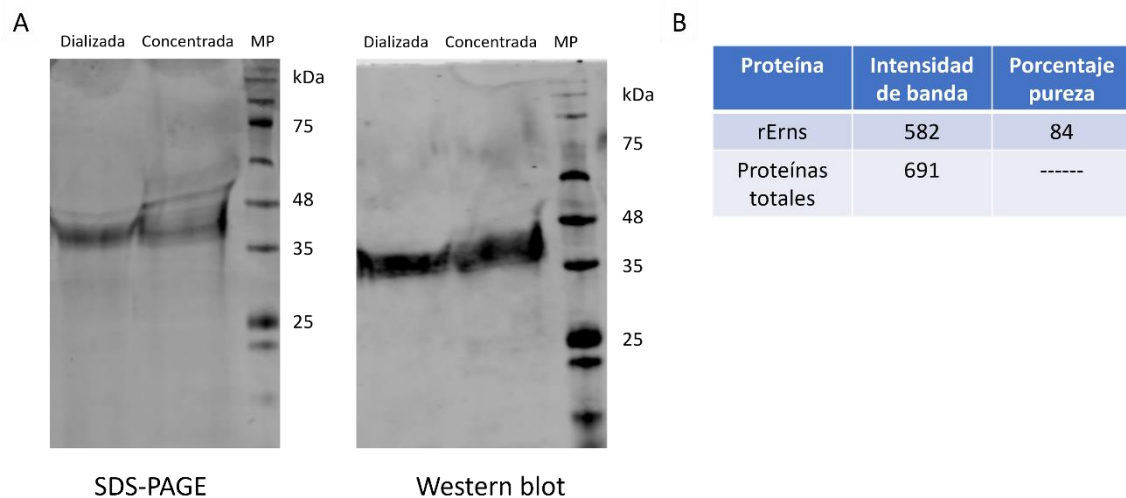


Figura 9. Determinación de la pureza de la proteína rErns. A) SDS-PAGE y *Western blot* de la muestra concentrada y posteriormente dializada. MP: marcador de peso. B) Análisis de pureza por densitometría de la proteína rErns después de proceso de diálisis. MP: Marcador de peso molecular

5.4 Obtención de hibridomas productores de anticuerpos anti-rErns

Los cultivos de hibridomas obtenidos se evaluaron para identificar hibridomas productores de anticuerpos contra la proteína rErns. Para esto se analizó el sobrenadante de los cultivos de hibridomas por Elisa indirecto. De un conjunto de 20 hibridomas evaluados se seleccionaron los que tuvieron una absorbancia mayor a 1,0 en el ensayo de ELISA. Se encontraron 18 hibridomas productores de anticuerpos anti-rErns (Figura 10) por sobre el valor de corte establecido, los cuales se almacenaron en nitrógeno líquido. Continuamos trabajando con los clones 1F5, 1F2 y 1H4 para la obtención de anticuerpos monoclonales.

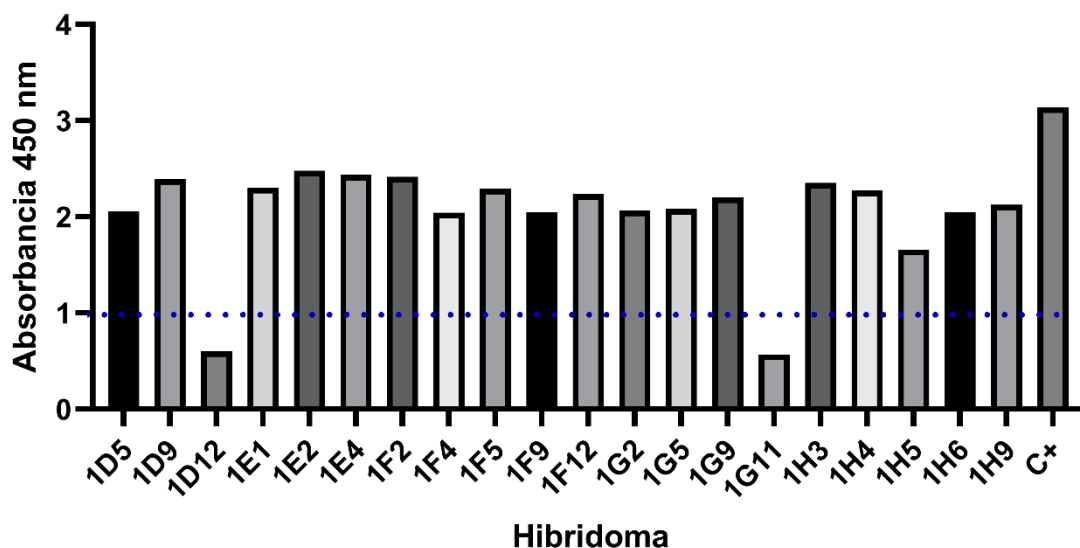


Figura 10. Análisis de anticuerpos anti-rErns expresados en el medio de cultivo de hibridomas. Evaluación de la presencia de anticuerpos anti-rErns mediante ELISA indirecto del medio de cultivo de los hibridomas producidos. (C+): Medio obtenido de la perfusión del bazo de ratones inmunizados con la proteína rErns.

5.5 Obtención de anticuerpos monoclonales

A partir de los hibridomas seleccionados, se evaluaron los sobrenadantes de cultivo de distintos clones de células de hibridoma mediante ELISA indirecto para verificar la presencia de anticuerpos contra la proteína rErns. Como resultado se obtuvieron 12 clones productores de anticuerpos IgG de la subclase IgG1 (Figura 11). Se seleccionaron 4 clones: F2D11, F5C4, F5D9 y H4C5, que fueron amplificados y purificados mediante una resina de proteína G. Se observó la presencia de las cadenas livianas y pesadas de la IgG murina en la muestra purificada (Figura 12). Los anticuerpos purificados se cuantificaron y se llevaron a una concentración de 1 mg/mL.

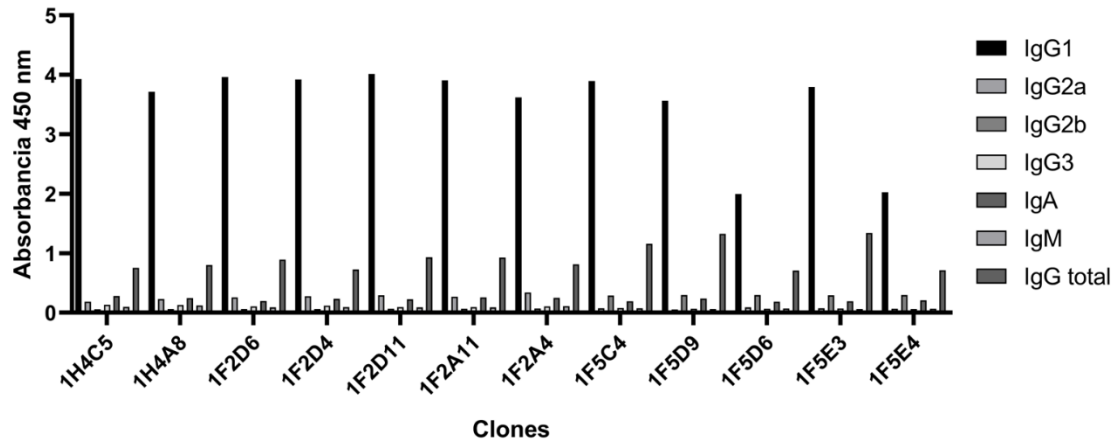


Figura 11. Identificación de subclase de anticuerpos obtenidos. Análisis por ELISA indirecto de la subclase los anticuerpos monoclonales obtenidos utilizando anticuerpos específicos anti-IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, IgM e IgG total.

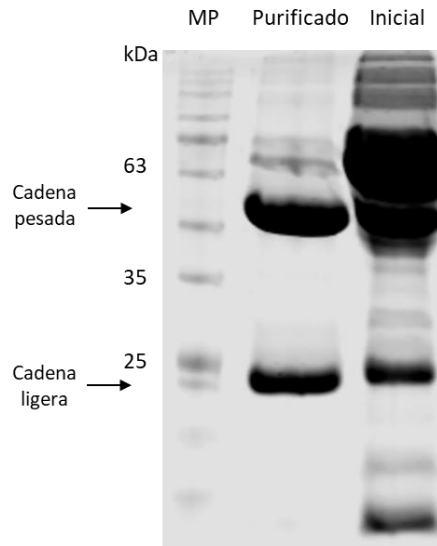


Figura 12. Purificación del anticuerpo monoclonal anti-Erns mediante cromatografía de afinidad a proteína G. Comparación en SDS-PAGE de la muestra purificada de anticuerpos monoclonales por resina de proteína G y muestra Inicial. MP: Marcador de peso molecular.

Los anticuerpos seleccionados fueron evaluados por los inmunoensayos de ELISA indirecto y *Western blot* para el reconocimiento de la proteína rErns. En el

inmunoensayo de ELISA indirecto los anticuerpos F5C4, F2D11 y F5D9 reconocieron a la proteína rErns llegando a diluciones de 1/128000 con valores de absorbancia a 450 nm de 1,0 a diferencia del anticuerpo H4C5 que llego a diluciones de 1/16.000 para el mismo valor de absorbancia (Figura 13).

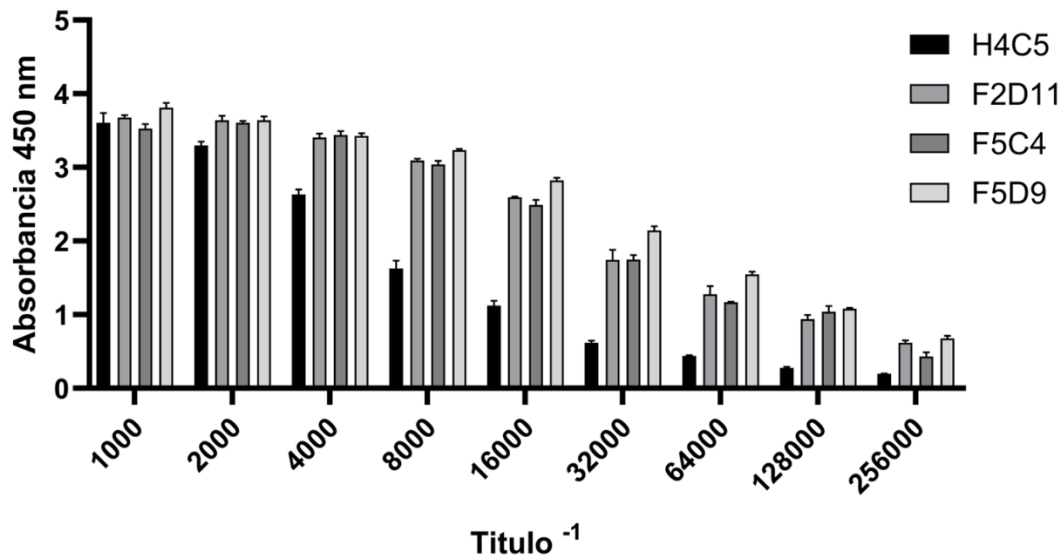


Figura 13. Titulación de anticuerpos monoclonales anti-Erns mediante ELISA indirecto. Análisis de la detección de la proteína rErns por ELISA indirecto utilizando diluciones crecientes de los anticuerpos monoclonales H4C5, F2D11, F5C4 y F5D9. Los datos son presentados como el promedio \pm desviación estándar de 2 réplicas.

Los ensayos de *Western blot*, mostraron que los cuatro anticuerpos evaluados reconocen específicamente la proteína rErns (Figura 14).

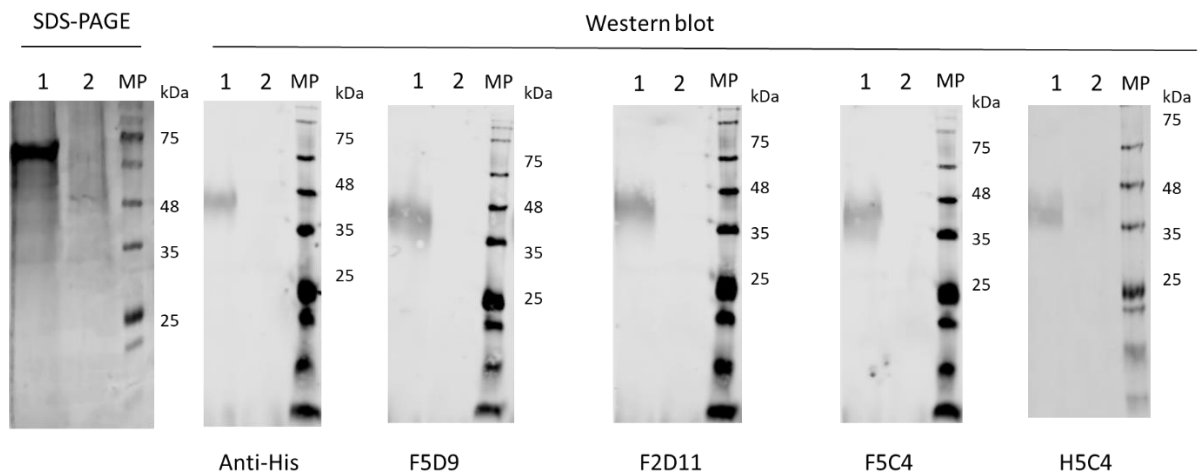


Figura 14. Detección de la proteína rErns por los anticuerpos monoclonales en técnica de Western blot. Evaluación del reconocimiento de la proteína rErns por los anticuerpos monoclonales H4C5, F2D11, F5C4 y F5D9. 1: Medio de cultivo de células SF21 infectadas con el baculovirus. 2: Medio de cultivo de células no infectadas por el baculovirus (control). MP: Marcador de peso molecular.

Una vez confirmada la detección de la proteína rErns por los anticuerpos monoclonales seleccionados, se estimó la K_D mediante ELISA indirecto. Los resultados obtenidos arrojaron valores de K_D en la escala nanomolar (nM) baja para los cuatro anticuerpos analizados (Figura 15), siendo la K_D más alta la del anticuerpo H5C4. Los valores obtenidos indicarían que los anticuerpos producidos serían de alta afinidad (Björkelund et al., 2011). Los anticuerpos monoclonales anti-Erns reconocen su ligando con una K_D en el rango nanomolar, lo que permite su uso en inmunoensayos como ELISA indirecto y Western blot. Además, pueden emplearse como moléculas de captura en dispositivos IFL diseñados para detectar el VDBV en muestras animales.

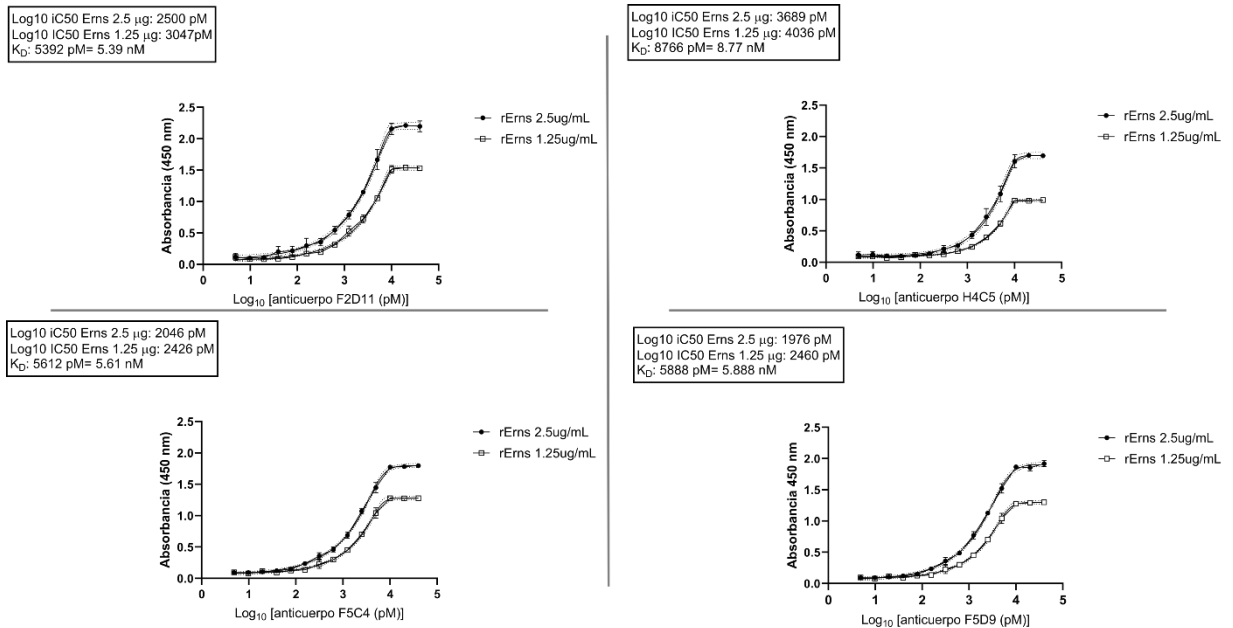


Figura 15. Estimación de la KD de la interacción rErns-anticuerpo monoclonal mediante ELISA Indirecto. Curvas experimentales de unión de los anticuerpos H4C5, F2D11, F5C4 y F5D9 a dos concentraciones de recubrimiento de rErns (2,5 y 1,25 μg/ml). Los datos son presentados como el promedio ± desviación estándar de 3 réplicas.

5.5 Producción de anticuerpos policlonales IgY contra la proteína rErns e IgG murina.

La presencia de las IgY extraída desde los huevos de las gallinas inmunizadas fue confirmada mediante SDS-PAGE. En este ensayo se observaron bandas mayoritarias que se corresponden con los pesos moleculares de las cadenas livianas y pesadas de las IgY, de 25 y 65 kDa, respectivamente (Figura 16). La pureza de la IgY obtenida se estimó por densitometría utilizando el programa Image Studio Lite (Li-COR), los valores obtenidos fueron del 84,9 % para la IgY

extraída de huevos de gallinas inmunizadas con rErns y del 87 % para las IgY extraídas de huevos de gallinas inmunizadas con IgG murina.

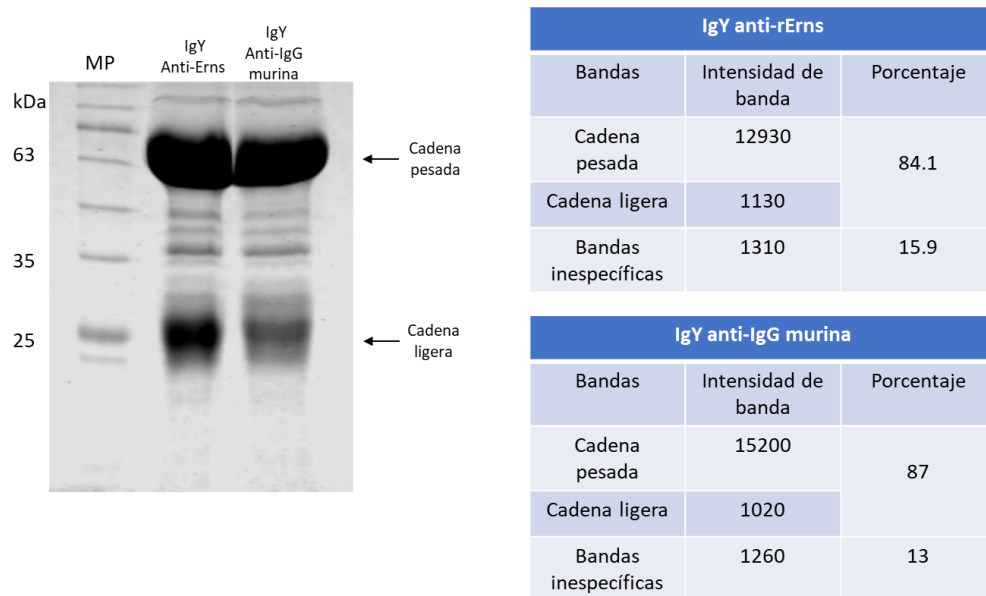


Figura 16. Evaluación de la pureza de anticuerpos IgY extraídos de yema de huevo. Estimación de la pureza de anticuerpos IgY anti-rErn e IgY anti-IgG murina por densitometría de las bandas identificadas mediante SDS-PAGE. MP: Marcador de peso molecular.

Se evaluaron los anticuerpos extraídos de los huevos tomados entre la semana 5 y 8 post-inmunización mediante ELISA indirecto contra la proteína rErns y e IgG de ratón. Los anticuerpos IgY extraídos de huevos de gallinas inmunizadas con la proteína rErns dieron señal de reconocimiento positivo en diluciones hasta 1/64.000, con valores de absorbancia de 1,0 para los anticuerpos extraídos de huevos tomados entre la semana 5 y 7, observándose una disminución de la señal en la semana 8 (Figura 17). Por lo tanto, se seleccionaron las muestras de

los huevos tomados entre la semana 5 y 7 para obtener los anticuerpos anti-rErns.

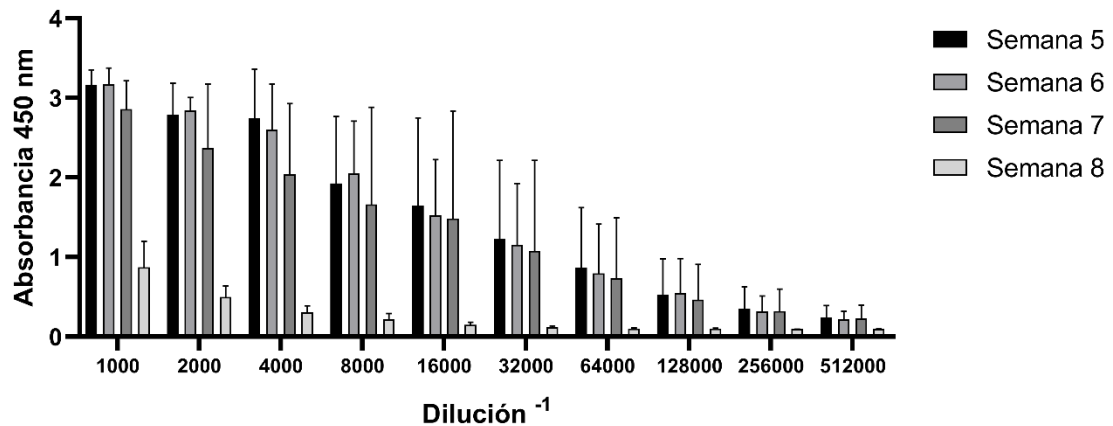


Figura 17. Título de anticuerpos IgY anti-rErns. Análisis de la detección de la proteína rErns por ELISA indirecto utilizando diluciones seriadas de los anticuerpos IgY anti-rErns extraídos desde la yema de huevos tomados entre las semanas 5 y 8 post inmunización. Los datos son presentados como el promedio \pm desviación estándar de 2 réplicas.

También se evaluó el reconocimiento de la proteína rErns por los anticuerpos IgY en inmunoensayo de *Western blot*. Los anticuerpos IgY obtenidos reconocieron específicamente a la proteína rErns y, además, no se observaron señales en los carriles correspondientes al control negativo de medio de cultivo, ni en el suero bovino de animales sanos (Figura 18). Con estos resultados se confirma la producción de anticuerpos IgY dirigidos contra la proteína rErns y que estos son funcionales tanto en el inmunoensayo ELISA, como en el *Western blot*.

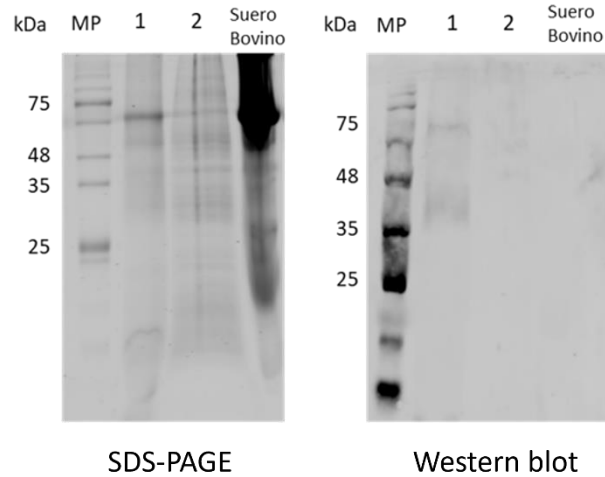


Figura 18. Reconocimiento de proteína rErns por anticuerpos IgY anti-rErns en inmunoensayo de *Western blot*. Análisis del reconocimiento y especificidad de los anticuerpos aviares IgY-anti-rErns por la proteína rErns en medio de cultivo y unión a proteínas del suero bovino 1: Medio de cultivo de células SF21 infectadas con el baculovirus B6. 2: Medio de cultivo de células no infectadas por el baculovirus. MP: Marcador de peso molecular.

Los anticuerpos IgY anti-IgG murina reconocen a la IgG en ELISA indirecto, con señales superiores a 1,0 de absorbancia en diluciones de hasta 1/128.000 en las muestras de extracciones de anticuerpos a partir de huevos tomados entre las semanas 5 y 7 post inmunización, y una disminución en la señal en los anticuerpos extraídos en la semana 8 (Figura 19). Por lo tanto, se seleccionaron los anticuerpos extraídos desde los huevos tomados entre las semanas 5 y 7 para los trabajos posteriores.

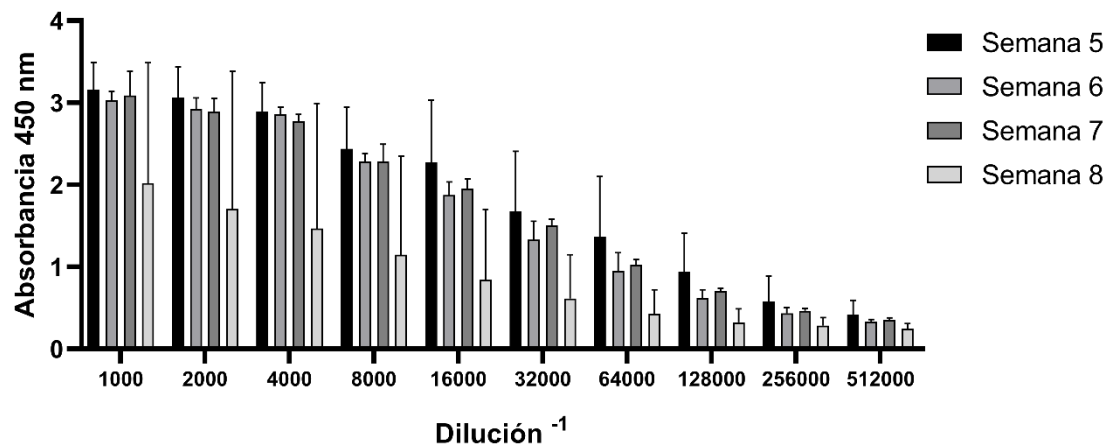


Figura 19. Título de anticuerpo IgY anti-IgG murina. Evaluación por ELISA indirecto de los títulos de anticuerpos IgY anti-IgG murina extraídos desde la yema de huevo a distintas semanas post-inmunización. Los datos son presentados como el promedio \pm desviación estándar de 2 réplicas.

Los anticuerpos IgY anti-IgG murina obtenidos también se evaluaron mediante el inmunoensayo de *Western blot* para la detección de IgG murina. Estos reconocen claramente la IgG murina, sin embargo, no se observaron señales de reconocimiento en la muestra de la IgG bovina, ni en ningún componente del suero bovino (Figura 20). Con estos resultados demostramos que la IgY anti-IgG murina producida es específica para esta IgG y que no reacciona a los componentes del suero bovino, lo que indica que se pueden utilizar en el dispositivo IFL con muestras de suero bovino.

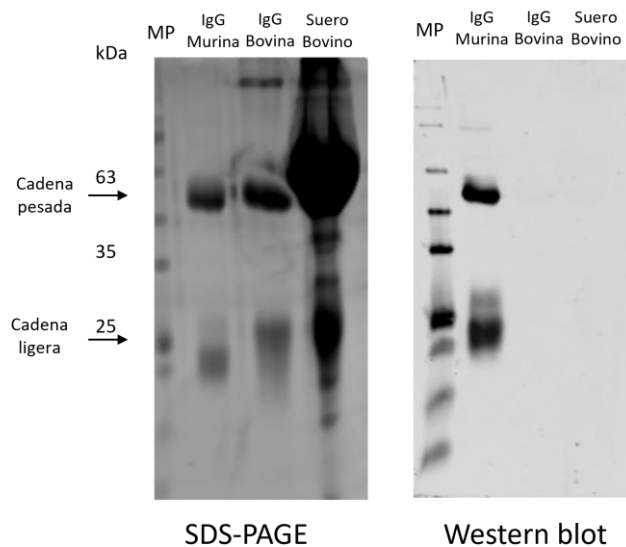


Figura 20 Reconocimiento de IgG murina por anticuerpos IgY anti-IgG murina en inmunoensayo de Western blot. Análisis del reconocimiento y especificidad de los anticuerpos IgY anti-IgG murina en muestras de IgG de ratón, IgG bovina y suero bovino. MP: Marcador de peso molecular.

5.6 ELISA sándwich para la detección de la proteína Erns

Los resultados obtenidos de la producción y reconocimiento de los anticuerpos tanto, monoclonales como IgY, demostraron su utilidad en los inmunoensayos de ELISA y *Western blot*. Por lo tanto, se evaluó el uso del par anticuerpo monoclonal/IgY anti-Erns en el inmunoensayo de ELISA formato sándwich para comprobar el potencial uso como pareja de anticuerpos para sistemas de detección LFIA. Se probaron 3 anticuerpos monoclonales como anticuerpos de captura a 2 concentraciones distintas, y los anticuerpos IgY como anticuerpos de detección (Figura 21). Los resultados demostraron que las parejas de anticuerpo anti-rErns F2D11, F4C4 y F5D9 con el anticuerpo IgY anti-rErns detectaron la proteína rErns purificada a distintas concentraciones como en medio de cultivo

(Figura 22). Con estos resultados se avanzó a la producción y ensamblaje del sistema IFL para detección de la proteína Erns.

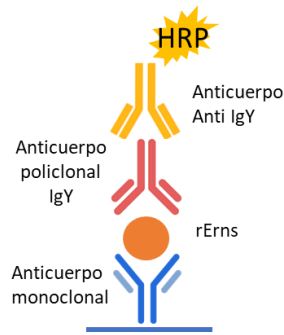


Figura 21 Esquema de ELISA sándwich para detección de la proteína rErns.

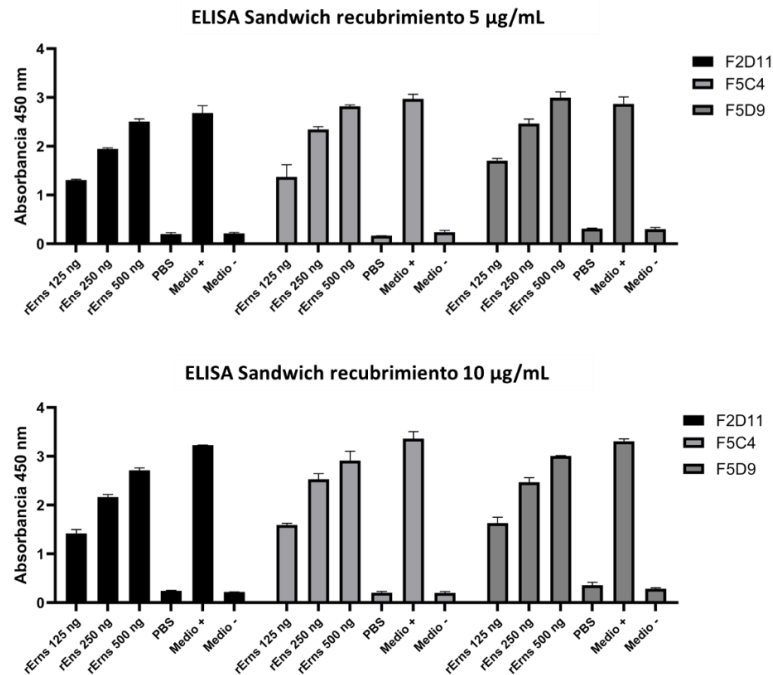


Figura 22. Detección de la proteína rErns mediante ELISA sándwich utilizando parejas de anticuerpos monoclonales y aviares IgY. Evaluación de los anticuerpos monoclonales anti-rErns como anticuerpos de captura y anticuerpos IgY anti-rErns como anticuerpos de detección en formato ELISA sándwich utilizando cantidades crecientes de rErns. Los datos son presentados como el promedio \pm desviación estándar de 2 réplica. Medio (+): Medio de cultivo de células SF21 productoras de rErns. Medio (-): Medio de cultivo de células SF21.

5.7 Producción y evaluación de prototipo de tira reactiva para la identificación de la proteína Erns del VDVB

5.7.1 Producción de nanopartículas de oro

Las partículas de oro se elaboraron mediante la metodología de reducción por citrato, preparándose nanopartículas de 40 nm. El escaneo espectral de las partículas producidas mostró un máximo de absorbancia a 530 nm (Figura 23A), lo que corresponde a espectros de partículas de oro de tamaño aproximado de 40 nm (Yokota, 2010). La presencia y tamaño aproximado de las nanopartículas de oro se confirmó mediante microscopía electrónica observándose nanopartículas esféricas de bordes regulares con un tamaño aproximado de 40 nm (Figura 23B).

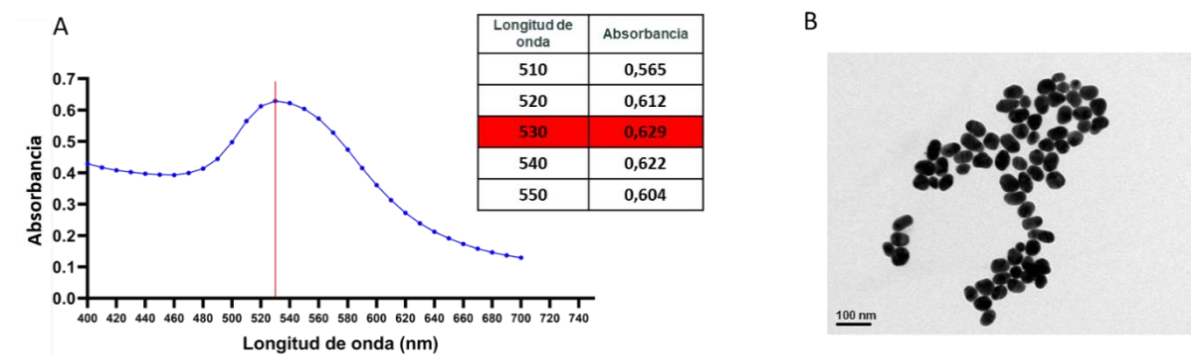


Figura 23. Producción de AuNPs de 40 nm. Estudio del tamaño y forma de AuNPs generadas. A): Espectro de absorbancia de las AuNPs. B): Estimación del tamaño y forma de las AuNPs por microscopía electrónica.

5.7.2 Conjugación de anticuerpos con nanopartículas de oro

Los anticuerpos monoclonales F5C4, F2D11 y F5D9 fueron conjugados con nanopartículas de oro de 40 nm. Para ello, se identificó la cantidad mínima de anticuerpo necesaria para producir un conjugado de oro estable. A partir 3 μg de F5C4, 2 μg de F5D9 y 2 μg de F2D11 se mantuvo el color rojizo en las nanopartículas de oro conjugadas y no hay variaciones en su espectro de absorbancia manteniéndose su máximo de absorción en 530 nm al aplicar una solución de NaCl 10% (Figura 24). Por tanto, estas condiciones se seleccionaron como cantidades de trabajo para la conjugación de los anticuerpos 3 μg de F5C4, 2 μg de F5D9 y 2 μg de F2D11.

5.7.3 Evaluación del pH para la conjugación de anticuerpos con nanopartículas de oro.

El pH de trabajo también es un factor que influye en la estabilidad de las nanopartículas de oro y en la conjugación a las proteínas, por lo que se evaluó la estabilidad de los conjugados producidos con soluciones de nanopartículas de oro a distintos pH. Se observó que los conjugados producidos son estables en un rango amplio de pH (desde 4 a 10) manteniendo la coloración rojiza y su espectro de absorción cuando se utilizó el anticuerpo F5C4 (Figura 25).

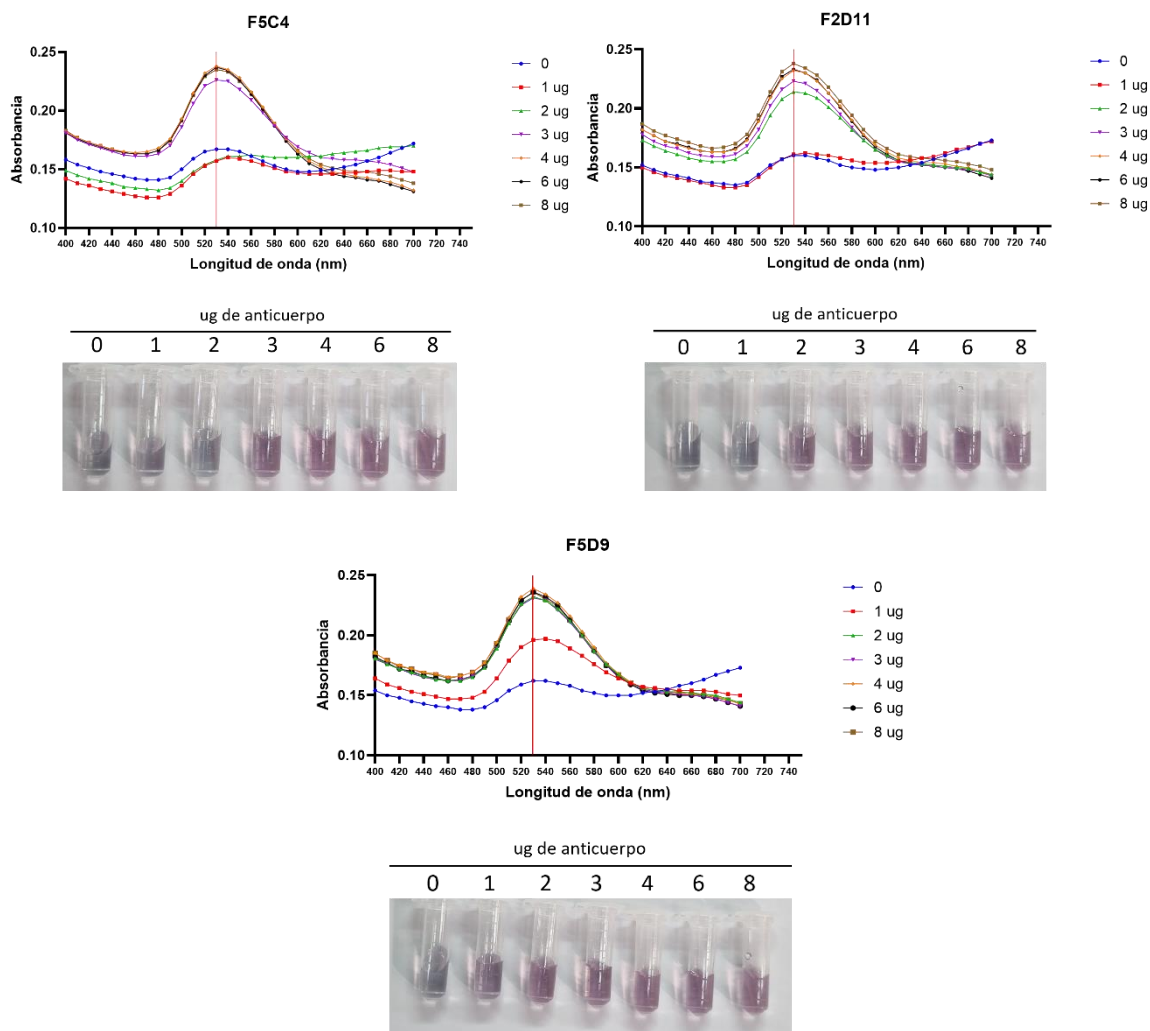


Figura 24. Obtención de un conjugado estable de anticuerpos con AuNPs. Evaluación de la cantidad mínima de anticuerpo para la obtención de conjugados estables mediante análisis colorimétrico y de espectro de absorción de los conjugados con los anticuerpos monoclonales. A: anticuerpos F5C4, B: anticuerpo F5D9 y C: anticuerpo F2D11.

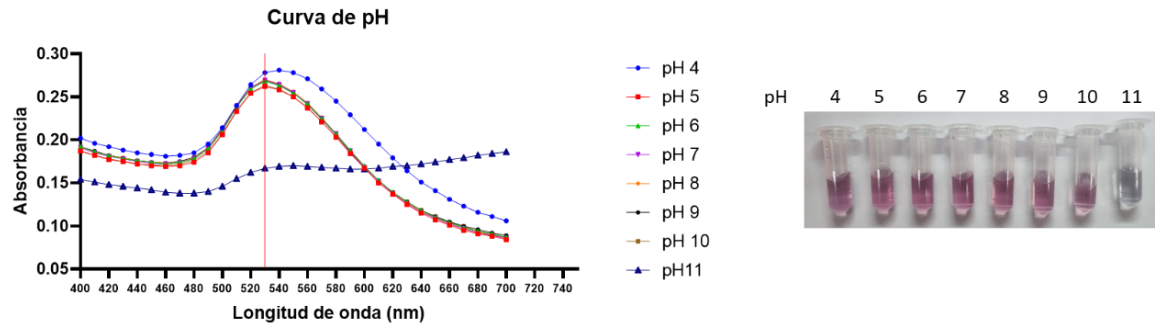


Figura 25 . Evaluación de estabilidad del anticuerpo F5C4 conjugado con nanopartículas de oro a distintos rangos de pH. Análisis del colorimétrico y del espectro de absorción de la conjugación del anticuerpo F5C4 con AuNPs a distintos pH.

5.7.4 Elaboración de prototipo de IFL para detección de la proteína Erns

Se inició el proceso de ensamblaje del dispositivo de IFL para la detección de la proteína Erns utilizando los anticuerpos monoclonales e IgY obtenidos. Para ello, se diseñó un dispositivo que utiliza anticuerpos monoclonales marcados con nanopartículas de oro como anticuerpos de detección; los anticuerpos IgY anti-rErns como anticuerpos de captura en la línea de prueba del dispositivo y los anticuerpos IgY anti-IgG murina como anticuerpos de captura en la línea de control (Figura 26).

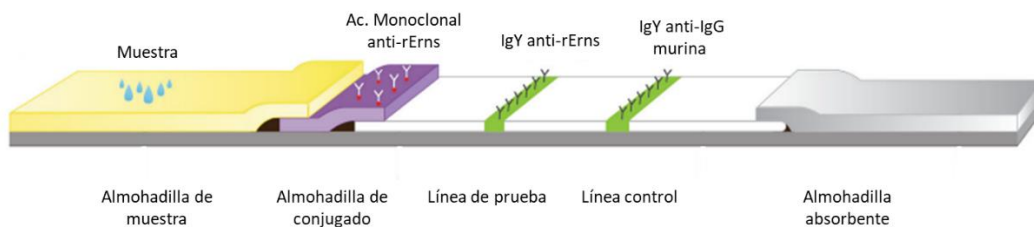


Figura 26. Esquema del diseño del dispositivo IFL para la detección de la proteína Erns. Representación del prototipo y sus componentes moleculares.

Se evaluó el uso de los anticuerpos monoclonales F5C4, F2D11 y F5D9 conjugados con nanopartículas de oro utilizando soluciones de conjugado con valores de DO de 1,0 y 2,0 a medidos a 530 nm en la almohadilla de conjugado y los anticuerpos de las líneas de prueba y de control a una concentración de 1 mg/mL. Se observó que los 3 anticuerpos marcaron las líneas de prueba y control al utilizar la proteína rErns y solo se marcó la línea control al utilizar PBS (Figura 27). Al comparar los dispositivos ensamblados con los 3 anticuerpos monoclonales distintos, se determinó que los anticuerpos F5C4 y F2D11 mostraron una mayor intensidad de color en la línea de prueba y, entre estos 2 dispositivos, se observó una proporción equilibrada en la marca de la banda control y la banda de prueba cuando se utilizó el anticuerpo F5C4. Con estos resultados, se seleccionó este anticuerpo conjugado para continuar con el proceso de estandarización del prototipo de IFL.

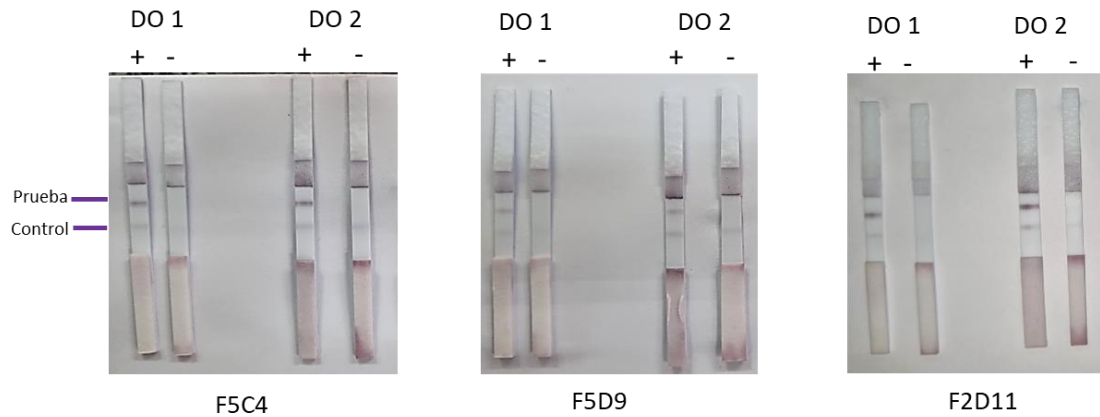


Figura 27. Evaluación del prototipo IFL utilizando diferentes anticuerpos monoclonales conjugados con nanopartículas de oro. Análisis del funcionamiento de las tiras IFL mediante el marcaje de las líneas de prueba y control. Se aplicaron las muestras (+): rErns purificada. (-): PBS.

Se evaluó la cantidad de anticuerpos conjugado agregado a la almohadilla de conjugación, observándose que las líneas de prueba y control se marcan con una mayor intensidad utilizando una solución de conjugado con una DO de 10 y 20, leídas a 530 nm (Figura 28).

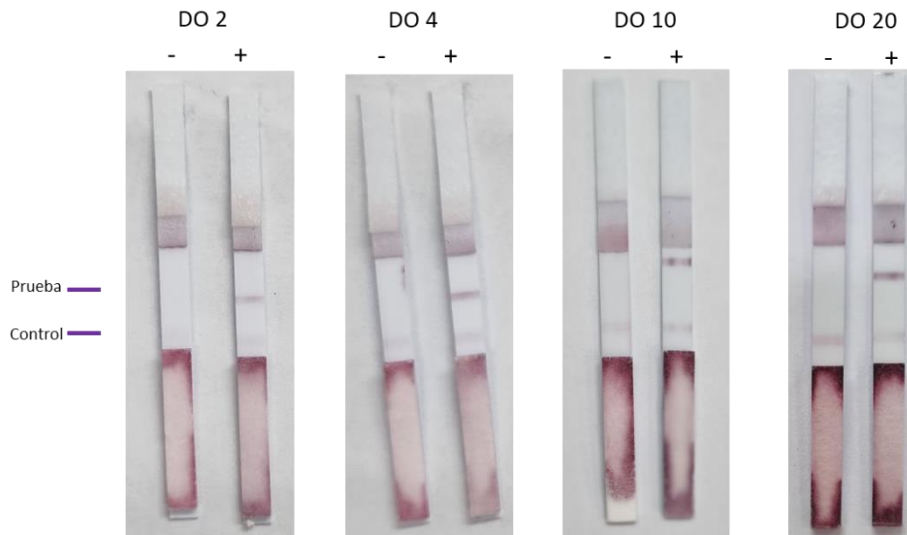


Figura 28. Efecto de distintas concentraciones de anticuerpo F5C4 conjugado en ensayo de IFL. Análisis del marcaje de las bandas de prueba y control con cantidades crecientes de anticuerpo conjugado. Se aplicaron las muestras (+): rErns purificada. (-): PBS.

Con esas concentraciones de conjugado se evaluó la detección de distintas cantidades de rErns en el prototipo de IFL producido. Se observaron marcas legibles en la línea de prueba hasta 25 ng de proteína (Figura 29), a menores concentraciones la banda clara no resulta visible. Por lo tanto, el límite de detección del prototipo ensamblado se consideró en 25 ng.

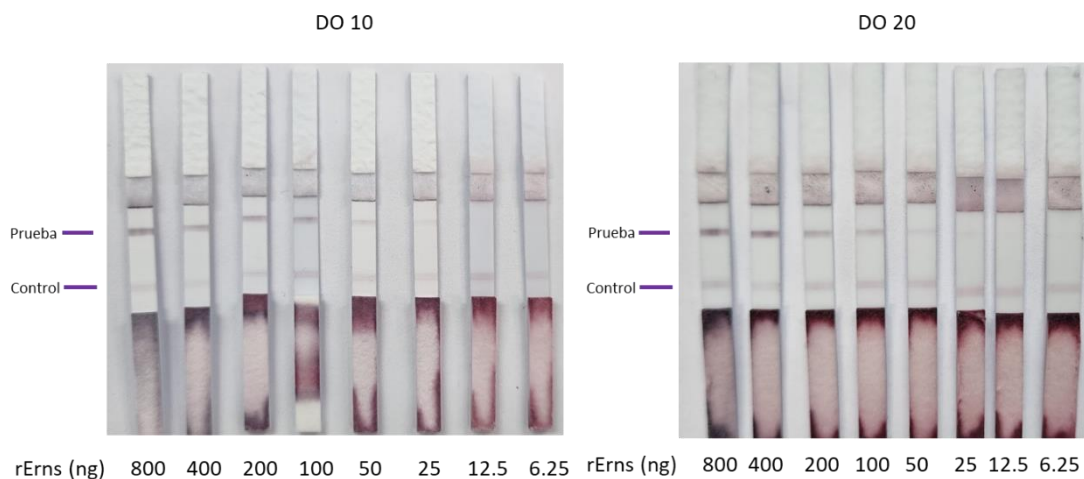


Figura 29. Análisis del límite de detección de proteína rErns en el prototipo de IFL ensamblado. Evaluación del marcaje de las líneas de prueba y control a distintas de rErns.

Con las condiciones establecidas se probó el dispositivo evaluando sueros de animales negativos para Erns por ELISA IDEXX BVDV Ag/Serum Plus. Se utilizaron sueros en diluciones 1/2, 1/5 y 1/10 en PBS. Se colocaron 100 uL de muestra utilizando dispositivos elaborados con conjugados de 10 y 20 de DO. Se detectó un marcaje visible solo en la línea de control y no de la línea de prueba, siendo este más notorio en el dispositivo ensamblado con el conjugado de 20 de DO. Este resultado sugiere que el dispositivo IFL, en las condiciones de diseño descritas, no reconoce elementos presentes en los sueros de animales negativos para Erns, lo que se refuerza por hecho de que no se observan falsos positivos.

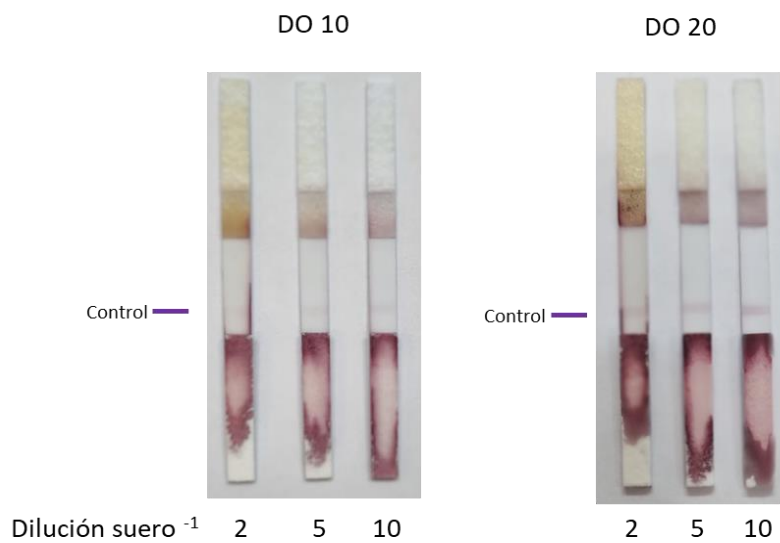


Figura 30. Evaluación de sueros negativos en prototipo de IFL ensamblado. Análisis del funcionamiento de prototipo de IFL con concentraciones de conjugado de 10 y 20 de DO utilizando sueros bovinos negativos para anticuerpos y antígenos del VDBV.

6. DISCUSIÓN

6.1 Proteína rErns del VDVB obtenida desde el medio de cultivo de células SF21.

El objetivo de este trabajo es desarrollar un prototipo de ensayo IFL para detectar la proteína Erns del VDVB. Esta se considera una de las proteínas más inmunogénicas del virus y, además, está altamente conservada entre los distintos subtipos del virus, por lo que es un excelente candidato para ser utilizada en sistemas de detección del VDVB. Este antígeno se obtuvo de manera recombinante utilizando células de insecto como plataforma de expresión. El uso de estas células para la producción de proteínas recombinantes está ampliamente descrito y se ha utilizado para la producción de proteínas recombinantes tanto en la industria biofarmacéutica como en la investigación (Pidre et al., 2023).

Para la expresión recombinante de Erns se diseñó una construcción en la que se incorporó la secuencia codificante de la proteína nativa de 253 aminoácidos, se añadió una señal de secreción correspondiente a la secuencia de secreción de insecto correspondiente a la proteína de 30 kDa del gusano de seda en el extremo N-terminal y una etiqueta de histidina en el C-terminal, con el objetivo de obtener la proteína desde el medio de cultivo celular y facilitar su reconocimiento y purificación. La rErns se obtuvo con un peso molecular aproximado de 43 kDa detectada por la técnica de *Western blot* (Figura 5), lo cual está de acuerdo con reportes de su producción en células de insecto, en las líneas SF9

(Vijayaraghavan et al., 2012; Z. Wang et al., 2021). La identificación de esta proteína en el medio de cultivo de las células infectadas (Figura 6), corrobora el correcto funcionamiento de la secuencia de secreción añadida en diseño del a construcción genética. Durante el proceso de selección de las condiciones de producción de la proteína rErns se observó que a concentraciones de infección de 0,1 UFC/célula obtuvo una mayor intensidad de banda en ensayo de *Western blot*, lo que sugiere que se produce una mayor cantidad de proteína en esta condición. Resultados similares ya han sido observado en otros trabajos, donde se utilizó menos de una partícula viral por célula. (Radford et al., 1997; Üstün-Aytekin et al., 2014). Este efecto se debe a que el uso de una concentración menor a 1 partícula viral por célula da lugar a un proceso de infección en dos fases. En la primera fase, sólo se infecta una parte de las células las que comienzan a producir la proteína recombinante y también producen nuevas partículas de virus. En la segunda fase de infección, estas nuevas partículas de virus infectan a las otras células que no fueron infectadas en la primera fase de infección, las cuales siguieron proliferando dando a lugar a una mayor densidad celular al inicio de la segunda fase (Zitzmann et al., 2017).

La purificación de la variante recombinante de rErns mediante IMAC estuvo favorecida por el acoplamiento a la etiqueta de histidina agregada durante el diseño molecular (Figura 6), lo que indica que la etiqueta estaría expuesta y permitiendo su unión a los iones de níquel, lo que facilitó su purificación desde el medio de cultivo. Estos resultados demuestran que el diseño utilizado para la

secreción al medio de cultivo y purificación de la proteína rErns funcionó correctamente.

6.2 Obtención de anticuerpos monoclonales anti-rErns de alta afinidad

Con la proteína rErns purificada se inmunizaron ratones BALB/c para obtener anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales representan una valiosa herramienta en los sistemas de inmunodetección, ya que proporcionan especificidad a las técnicas de inmunodetección. La especificidad es una característica deseada en los anticuerpos que tienen por objetivo la detección de un antígeno específico, especialmente en sistemas diagnósticos basados en inmunodetección. Para otorgar una mayor especificidad a los sistemas de inmunodetección se prefiere el uso de anticuerpos monoclonales, debido que estos reconocen un epítipo específico disminuyendo la posibilidad de producir reacciones de cruzadas con otros antígenos.

Los 12 clones productores de anticuerpos obtenidos correspondieron a la subclase de IgG1 (Figura 11). De estos hibridomas se seleccionaron 4 clones, los clones F5C4, F2D11, H4C5 y F5D9, a partir de los cuales se purificaron los anticuerpos producidos. Los anticuerpos seleccionados se evaluaron en técnicas de inmunodetección de ELISA indirecto y *Western blot* para la detección de rErns. Los cuatro anticuerpos seleccionados reconocen específicamente la proteína rErns mediante *Western blot* (Figura 14), sin observarse diferencias en el reconocimiento de la proteína. No obstante, en el ensayo de ELISA los

anticuerpos F5C4, F2D11 y F5D9 alcanzaron niveles de absorbancia mayores a diluciones más altas, llegando a valores cercanos a 1 de absorbancia a diluciones de 1/128.000 en comparación con el anticuerpo H5C4, que solo llegó a similares valores de absorbancia en diluciones de hasta 1/16.000 (Figura 13), lo que podría indicar que este anticuerpo posee una menor afinidad por la proteína rErns en comparación con los otros. Los resultados mostraron que las K_D estimadas para los anticuerpos obtenidos se encuentran en el rango nanomolar bajo y se menciona en bibliografía que los anticuerpos que poseen una K_D del rango nanomolar bajo (<10 nM) (Griffiths et al., 1994; Rathanaswami et al., 2005) corresponderían a anticuerpos de alta afinidad. De todos ellos, el que alcanza un valor de K_D más alto es el H4C5 (Figura 15), por lo que presenta una menor afinidad en comparación con los otros anticuerpos, lo que estaría en concordancia con los resultados del ELISA indirecto, en el que este anticuerpo registró menores niveles de absorbancia. Los anticuerpos de alta afinidad se unen más rápido a sus dianas y por más tiempo (Wark & Hudson, 2006), lo cual los hace una excelente opción para ser utilizados en ensayos IFL, debido al poco tiempo de interacción entre los anticuerpos y sus antígenos en esta técnica. Se ha demostrado que la afinidad de los anticuerpos monoclonales afecta la sensibilidad en pruebas de inmunodetección en papel (Murray et al., 2021) y en IFL (Cavalera et al., 2020; Y. Li et al., 2020), donde los sistemas ensamblados con anticuerpos con mayor afinidad produjeron un límite de detección menor. Por lo tanto, la obtención de anticuerpos anti-rErns con K_D del rango nanomolar contribuirá a un

mejor desempeño del IFL para la detección de la proteína Erns. En bibliografía existe solo un trabajo (Reza Seyfi Abad Shapouri et al., 2015) en el cual, se describe la producción de un anticuerpo monoclonal contra la proteína Erns del BVDV, demostrando el reconocimiento de la proteína mediante la técnica de *Western blot*, en comparación con nuestro trabajo, donde se analizamos la afinidad de los anticuerpos (Figura 15) y reconocimiento de la proteína rErns mediante las técnicas de inmunodetección de *Western blot* (Figura 14) y ELISA (Figura 13) .

6.3 Especificidad de anticuerpos IgY anti-rErns y anti-IgG murina y su uso en inmunoensayos.

La yema de huevo representa una importante fuente de anticuerpos IgY, los cuales poseen características favorables para su uso en sistemas de inmunodetección. Los anticuerpos IgY anti-rErns y anti-IgG murina obtenidos a partir de los huevos de gallinas inmunizadas identifican la proteína rErns e IgG murina en los inmunoensayos de ELISA indirecto y *Western blot*. Actualmente, ya se encuentran trabajos donde se ha probado la especificidad y utilidad de las IgY en distintos inmunoensayos como *Western blot*, ELISA e inmunohistoquímica (da Silva et al., 2018; Jen et al., 2019). Los anticuerpos IgY anti-rErns obtenidos de huevos tomados entre la semana 5 y 8 después de la inmunización mostraron reconocieron la proteína rErns mediante ELISA indirecto (Figura 17), observándose una disminución de los valores de absorbancia en los anticuerpos

extraídos en la semana 8 en comparación con los otros días de evaluación, en los que se obtuvieron valores de absorbancia superiores a 1 en diluciones hasta 1/64.000. Por lo tanto, se seleccionaron para su uso los anticuerpos extraídos de los huevos tomados en las semanas 5 y 7. Los análisis de *Western blot* utilizando los anticuerpos IgY anti-rErns mostraron que las IgY obtenidas reconocen la proteína rErns y no reconocen elementos presentes en el suero bovino demostrando su especificidad. La alta especificidad de los anticuerpos IgY para su uso en aplicaciones diagnósticas ya ha sido reportada (de Faria et al., 2019; de Jesus et al., 2023; Pizarro-Guajardo et al., 2017; Y. Zhang et al., 2019) y nuestros resultados se alinean con lo publicado demostrando su utilidad como posible componente para pruebas de inmunodetección. La especificidad de estos anticuerpos disminuye la posibilidad de resultados erróneos por la interacción de los anticuerpos IgY con los componentes del suero. Solo una investigación relacionada a la utilización de anticuerpos IgY como agente de detección del VDBV se ha descrito (X. Zhang et al., 2016), donde se utilizan anticuerpos IgY anti-E2 mostrando la detección de la proteína E2 por las técnicas de ELISA y *Western blot*, además de la detección del virus demostrando el potencial de las IgY como agentes de detección del VDVB. En el caso de los anticuerpos IgY anti-IgG murina, estos la reconocieron en los inmunoensayos de ELISA indirecto y *Western blot*, observándose absorbancias superiores a 1 hasta una dilución de 1/128.000 (Figura 19). En el ensayo de *Western blot*, los anticuerpos pudieron discriminar entre muestras de IgG murina e IgG bovina y no reconocieron otras

proteínas presentes en el suero bovino (Figura 18). Estos resultados se concuerdan con lo publicado (Q. Zhang et al., 2020), donde se produjeron anticuerpos IgY anti-IgG murina observándose títulos de hasta 1/128.000 y además se determinó la especificidad de estas IgY pudiendo discriminar entre IgGs de distintas especies. Los resultados obtenidos demuestran la utilidad de los anticuerpos IgY detectando las proteínas diana, sin reconocer componentes del suero bovino y además, en el caso de los anticuerpos IgY anti-IgG murina discriminar entre la IgG murina y bovina. Estos resultados corroboran el potencial de los anticuerpos aviares en sistemas de inmunodetección.

6.4 Ensamblaje de prototipo de dispositivo IFL y desempeño.

Con los anticuerpos monoclonales e IgY anti-rErns obtenidos, se diseñó un ELISA de tipo sándwich para la detección de la proteína rErns. La realización de este inmunoensayo de ELISA se debe a que esta plataforma permite la evaluación de varias combinaciones de anticuerpos a la vez disminuyendo el tiempo de análisis de las posibles combinaciones de anticuerpos (Parolo et al., 2020), con esto evaluar la combinación de anticuerpos monoclonales e IgYs y seleccionar cuales de los anticuerpos monoclonales obtenidos puede utilizarse en combinación con los anticuerpos IgY. Los resultados mostraron que los anticuerpos F5C4, F2D11 y F4D9, al usarse como anticuerpos de captura en conjunto con el anticuerpo IgY anti-rErns como anticuerpos de detección, detectan la proteína tanto purificada como en el medio de cultivo, demostrando que los anticuerpos monoclonales

probados pueden ser utilizados en combinación con los anticuerpos IgY en inmunodetección formato sándwich.

Para el ensamblaje del prototipo de ensayo de flujo lateral se decidió usar un anticuerpo monoclonal marcado con AuNPs como agente de detección y los anticuerpos IgY anti-rErns en la línea de prueba como anticuerpos de captura. Las AuNPs son las partículas más utilizadas como agente de detección en IFL, debido a sus características ópticas que permiten la producción de partículas coloreadas con una intensidad de color y brillo que permiten la detección de señal colorimétrica a simple vista (J. Kim et al., 2023). Además, dentro de las ventajas de la utilización de las AuNPs se encuentra, un procedimiento de obtención estandarizado, mecanismos de conjugación bien conocidos y una señal fuerte (Parolo et al., 2020; Z. Wang et al., 2022). El uso del anticuerpo monoclonal en inmunoensayos como herramienta de detección se basa en la especificidad de estos anticuerpos, lo que evita uniones no deseadas, reduciendo la posibilidad de obtener un resultado falso positivo aumentando la especificidad de la técnica. El uso de un anticuerpo IgY impreso en la tira aumenta la posibilidad de reconocer la proteína de interés, debido a la amplia variedad de epítopes que pueden reconocer, lo que incrementa la posibilidad de unir la proteína ya marcada por el agente de detección y que esta se mantenga en la línea de prueba, lo que se traduce en una mayor intensidad de color y sensibilidad del prototipo propuesto. Para el marcaje de los anticuerpos monoclonales, se decidió utilizar AuNPs de 40 nm. Uno de los factores que afecta a la sensibilidad al utilizar AuNP es el tamaño

de la partícula. En los sistemas de IFL se utilizan generalmente AuNP de entre 20 y 40 nm ya que, con tamaños menores de 15 nm, es difícil indicar un color claro y brillante, y las AuNP de más de 40 nm son inestables y producen precipitados (Bahadır & Sezgintürk, 2016). Las partículas de oro de 40 nm producen un color rojo intenso, lo que favorece su uso como agente de detección en los IFL. Así, los tamaños cercanos a 40 nm serían una mejor alternativa en IFL (Lou et al., 2012). Es por esto que se eligió el tamaño de AuNP de 40 nm para ser utilizado en nuestro sistema de detección. Los resultados mostraron que las AuNP producidas tenían un espectro de absorción con un pico de absorbancia a 530 nm, indicativo de AuNPs de un tamaño aproximado de 40 nm (Yokota, 2010), lo cual se confirmó mediante microscopía electrónica (Figura 23). Las partículas AuNPs producidas se conjugaron con los anticuerpos F5C4, F2D11 y F5D9. Para la conjugación de los anticuerpos, se buscaron las condiciones ideales de pH y cantidad de anticuerpo para la producción de conjugados estables. Se observó que la cantidad necesaria de anticuerpos para estabilizar las AuNP fue de 3 µg por cada 500 mL de solución de AuNP (Figura 24) y, además, estas eran estables en un rango amplio de pH (Figura 25). La estabilidad del conjugado mejora a medida que aumenta la concentración de anticuerpos debido al cambio de la carga superficial de las nanopartículas, haciendo que el conjugado sea más estable cuando las nanopartículas de oro están saturadas por los anticuerpos (Lou et al., 2012). Los resultados mostraron que la conjugación de las AuNPs con los anticuerpos entre los pH 7 y 8 era estable (Figura 25), por lo que se seleccionó el pH 8 para la

conjugación de los anticuerpos a las AuNPs. Este pH de trabajo ya ha sido utilizado en la conjugación de anticuerpos para pruebas de IFL (Cvak et al., 2012; Mdluli et al., 2014; Zhong et al., 2016) y se ha descrito que hay una mayor absorción de los anticuerpos a las AuNPs a pH entre 7,5-8,5 y además la unión de los anticuerpos a las AuNP entre estos pH orientaría la unión a la nanopartícula por el fragmento FC, dejando libres las regiones de reconocimiento de antígenos (Ruiz et al., 2019).

Una vez establecidas las condiciones de conjugación, se evaluó la utilización de los anticuerpos F5D9, F5C4 y F2D11 conjugados a las AuNP como agentes de reconocimiento de la proteína rErns en el sistema de LFA propuesto. Al evaluar el marcaje de las líneas de prueba y de control a simple vista, se observó que las tiras donde se utilizó el anticuerpo F5C4 presentaban mejor marcaje en las líneas de prueba y de control con respecto a los otros anticuerpos evaluados, tanto al utilizar la proteína recombinante como control positivo y PBS como control negativo (Figura 27). Por lo tanto, se decidió no seguir utilizando los anticuerpos F5D9 y F2D11. Aunque era posible identificar el marcaje de las líneas de prueba y de control al utilizar una solución del conjugado con una DO a 530 nm de 2 y 4, las líneas, especialmente la línea de control, seguían siendo tenues. La línea de control es muy importante, ya que es la manera de verificar el correcto desempeño del ensayo de flujo lateral, por lo que es crucial un buen marcaje de esta. Para mejorar la señal de las líneas de ensayo, se aumentó la concentración de la solución de conjugado probando 2,4,10 y 20 de DO (Figura 28), con lo cual se

logró mejorar la intensidad de las bandas, que pudieron observarse mejor a simple vista, especialmente en las condiciones de 10 y 20 de DO, seleccionando estas condiciones para las pruebas posteriores.

Los resultados mostraron que el prototipo de ensayo de flujo lateral propuesto identifica la proteína rErns y, además, el resultado es visible a simple vista hasta una cantidad de 25 ng (Figura 29). Trabajos publicados de sistemas IFL que utilizan AuNPs como conjugado muestran que los niveles de detección obtenidos se encuentran en el rango de ng/mL (D. H. Choi et al., 2010; G. Li, Wang, Li, et al., 2021; Zeng et al., 2009), en nuestro caso los niveles de detección obtenidos fueron de 25 ng en un volumen de 100 μ L (250 ng/mL). Según datos bibliográficos se estima que la concentración en sangre de la proteína Erns en animales PI es de 50.3 ± 20.5 ng/mL (Magkouras et al., 2008). Considerando que el límite detectado por el prototipo elaborado se necesitaría aumentar la sensibilidad del IFL por lo menos 5 veces para poder llegar a los niveles de Erns que se encuentran en el suero de los animales PI. Existen opciones para mejorar la sensibilidad del IFL manteniendo su característica de lectura a simple vista como aumentar la cantidad de anticuerpo de captura en la línea de prueba generando, aumentando la cantidad de anticuerpo conjugado en la tira (Parolo et al., 2020). Otras alternativas publicadas son la utilización de un reactivo amplificador de señal como el nitrato de plata, lo cual se ha publicado aumenta los límites de detección (Rodríguez et al., 2016) y otra alternativa es el cambio en sistema de detección utilizando una partícula de oro diferente como las *nanoflowers* o

nanoshells que se ha demostrado pueden aumentar la sensibilidad hasta 10 veces (Taranova et al., 2021; L. Zhang et al., 2015). Otro punto importante al analizar la composición del prototipo de IFL elaborado, es que los anticuerpos IgY utilizados no fueron purificados por afinidad al antígeno para obtener un anticuerpo policlonal anti-Erns o anti-IgG murina, eso quiere decir que de la población total de anticuerpos IgY solo una parte reconocen el antígeno deseado (10% aproximadamente). Por lo tanto, un paso previo de purificación por afinidad nos permitiría obtener un anticuerpo policlonal, lo cual al ser utilizado en el sistema de IFL podría aumentar la captura del complejo antígeno-anticuerpo marcado aumentando así la sensibilidad del prototipo. Al realizar las pruebas con las muestras de suero bovino negativos para la prueba de detección de antígenos VDVB Ag/Serum Plus Kit de la empresa IDDEX en distintas diluciones, no hay marcaje en las líneas de prueba y solo en las líneas de control, lo que indica que los anticuerpos monoclonales utilizados como anticuerpos de detección no se estarían uniendo a otras moléculas presentes en el suero bovino. Además, Se observó que, al utilizar las muestras de suero las líneas de control disminuían se marcaje en las tiras elaboradas con una solución de conjugado con una DO menor a 20 y que esto se solucionaba parcialmente diluyendo las muestras de suero (Figura 30). Este fenómeno se puede explicar por el efecto matriz. Este concepto describe la matriz como todos los componentes de la muestra, menos el analito. Estos componentes pueden alterar el proceso analítico y afectar a la sensibilidad y precisión de los resultados. En este caso, componentes de las muestras de

suero puede estar interactuando con los anticuerpos de detección, evitando que se unan a sus dianas correspondientes. Una de las maneras de disminuir este efecto es la dilución de las muestras (Chiu et al., 2010; Minic & Zivkovic, 2020), lo que se encuentra en concordancia con lo observado al aumentar las diluciones de las muestras de suero (Figura 30).

Con los resultados obtenidos se pudo confirmar el funcionamiento de la pareja de anticuerpos monoclonal e IgY anti-Erns, y que la producción de un sistema de IFL con estos anticuerpos es posible. Es necesario evaluar las condiciones óptimas que permitan un aumento de la sensibilidad y disminución del efecto matriz para un mejor funcionamiento del dispositivo IFL, con lo cual pueda convertirse en una real alternativa para la detección de animales PI por el VDVB en trabajo de campo.

7. CONCLUSIONES

Los dispositivos de inmunoensayo de flujo lateral representan una herramienta relevante para la detección de moléculas específicas a partir de mezclas complejas, ya que cumplen con los criterios ASSURED: asequibilidad, sensibilidad, especificidad, facilidad de uso, rapidez, robustez, ausencia de equipos complejos y disponibilidad para los usuarios finales. En este estudio, se desarrolló un prototipo IFL basado en la combinación de anticuerpos IgY aviares y anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína Erns del virus de la diarrea viral bovina. El prototipo diseñado demostró una capacidad de detección de hasta 25 ng de proteína recombinante rErns a simple vista. Estos resultados respaldan la hipótesis del trabajo, demostrando que el ensayo IFL desarrollado, utilizando el par anticuerpo IgY/anticuerpo monoclonal anti-rErns, permite el reconocimiento específico de la proteína diana. Dado su rendimiento, el prototipo propuesto podría convertirse en una herramienta útil para la identificación de animales persistentemente infectados con VDVB en condiciones de campo. Su implementación contribuiría a la reducción del tiempo necesario para la identificación y aislamiento de animales PI, lo que, a su vez, disminuiría la propagación del virus y mitigaría las pérdidas económicas asociadas a esta enfermedad en la producción bovina.

8. GLOSARIO

VDVB: Virus de la diarrea viral bovina.

SAG: Servicio Agrícola y Ganadero.

AuNPs: Nanopartículas de oro.

ARN: Ácido ribonucleico.

IFN: Interferón.

PI: Persistentemente infectado.

DVB: Diarrea viral bovina.

CP: Citopático.

NCP: No citopático.

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos.

IHC: Inmunohistoquímica.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa transcripción reversa.

HAT: Hipoxantina-Aminopterina-Timidina

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos.

PEG: Polietilenglicol

PBS: Tampón fosfato salino

GRAS: Generalmente Reconocido Como Seguro

IFL: Inmunocromatografía de flujo lateral.

LB: Luria-Bertani.

RPMI: Roswell Park Memorial Institute.

DMSO: Dimetilsulfoxido.

HRP: Peroxidasa de rábano.

p/v: Peso/volumen.

v/v: Volumen/volumen.

TAE: Tris-Acetato-EDTA.

SDS: Dodecil sulfato de sodio.

TBS: Tampón Tris salino.

MOI: Multiplicidad de infección

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A. T., El-Kafrawy, S. A., Sohrab, S. S., & Azhar, E. I. A. (2019). IgY antibodies for the immunoprophylaxis and therapy of respiratory infections. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 15(1), 264–275. <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1514224>
- Al-Kubati, A. A. G., Hussen, J., Kandeel, M., Al-Mubarak, A. I. A., & Hemida, M. G. (2021). Recent Advances on the Bovine Viral Diarrhea Virus Molecular Pathogenesis, Immune Response, and Vaccines Development. *Frontiers in Veterinary Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2021.665128>
- Alocilla, O. A., & Monti, G. (2022). Bovine Viral Diarrhea Virus within and herd prevalence on pasture-based dairy systems, in southern Chile dairy farms. *Preventive Veterinary Medicine*, 198(November 2021), 105533. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2021.105533>
- Amro, W. A., Al-Qaisi, W., & Al-Razem, F. (2018). Production and purification of IgY antibodies from chicken egg yolk. *Journal, Genetic Engineering & Biotechnology*, 16(1), 99–103. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.10.003>
- Andryukov, B. G. (2020). Six decades of lateral flow immunoassay: From determining metabolic markers to diagnosing covid-19. *AIMS Microbiology*, 6(3), 280–304. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2020018>
- Bahadır, E. B., & Sezgintürk, M. K. (2016). Lateral flow assays: Principles, designs and labels. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 82, 286–306. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.06.006>
- Behera, S. P., Mishra, N., Nema, R. K., Pandey, P. D., Kalaiyarasu, S., Rajukumar, K., & Prakash, A. (2015). Expression of bovine viral diarrhoea virus envelope glycoprotein E2 in yeast pichia pastoris and its application to an ELISA for Detection of BVDV neutralizing antibodies in cattle. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 36(6), 639–654. <https://doi.org/10.1080/15321819.2015.1032305>
- Bitsch, V., Hansen, K.-E. ., & Rønsholt, L. (2000). Experiences from the Danish programme for eradication of bovine virus diarrhoea (BVD) 1994–1998 with special reference to legislation and causes of infection. *Veterinary Microbiology*, 77(1–2), 137–143. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00270-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00270-4)

- Björkelund, H., Gedda, L., & Andersson, K. (2011). Avoiding false negative results in specificity analysis of protein-protein interactions. *Journal of Molecular Recognition*, *24*(1), 81–89. <https://doi.org/10.1002/jmr.1026>
- Booth, R. E., & Brownlie, J. (2012). Paper: Establishing a pilot bovine viral diarrhoea virus eradication scheme in Somerset. *Veterinary Record*, *170*(3), 73. <https://doi.org/10.1136/vr.100191>
- Brackenbury, L. ., Carr, B. ., & Charleston, B. (2003). Aspects of the innate and adaptive immune responses to acute infections with BVDV. *Veterinary Microbiology*, *96*(4), 337–344. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2003.09.004>
- Brock, K. V., Grooms, D. L., Ridpath, J., & Bolin, S. R. (1998). Changes in Levels of Viremia in Cattle Persistently Infected with Bovine Viral Diarrhea Virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *10*(1), 22–26. <https://doi.org/10.1177/104063879801000105>
- Brodersen, B. W. (2014). Bovine Viral Diarrhea Virus Infections: Manifestations of Infection and Recent Advances in Understanding Pathogenesis and Control. *Veterinary Pathology*, *51*(2), 453–464. <https://doi.org/10.1177/0300985813520250>
- Brownlie, J., Thompson, I., & Curwen, A. (2000). Bovine virus diarrhoea virus - Strategic decisions for diagnosis and control. *In Practice*, *22*(4), 176–187. <https://doi.org/10.1136/inpract.22.4.176>
- Bruschke, C. J., Hulst, M. M., Moormann, R. J., van Rijn, P. A., & van Oirschot, J. T. (1997). Glycoprotein Erns of pestiviruses induces apoptosis in lymphocytes of several species. *Journal of Virology*, *71*(9), 6692–6696. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.9.6692-6696.1997>
- Cakir-Koc, R., Budama-Kilinc, Y., Ustun, E., & Babur, C. (2020). Conjugation and Characterization of Latex Particles with Toxoplasma gondii-specific Immunoglobulin Y Antibodies for Diagnostic Aim and Evaluation Efficiency in In Vitro Culture. *Journal of Equine Veterinary Science*, *92*, 103145. <https://doi.org/10.1016/J.JEVS.2020.103145>
- Campbell, J. R. (2004). Effect of bovine viral diarrhoea virus in the feedlot. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, *20*(1), 39–50. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2003.11.003>
- Carlander, D., & Larsson, A. (2001). Avian Antibodies Can Eliminate Interference Due To Complement Activation In ELISA. *Upsala Journal of Medical Sciences*, *106*(3), 189–195. <https://doi.org/10.3109/2000-1967-145>

- Cavalera, S., Agulló, C., Mercader, J. V., Di Nardo, F., Chiarello, M., Anfossi, L., Baggiani, C., D'Avolio, A., Abad-Somovilla, A., & Abad-Fuentes, A. (2020). Monoclonal antibodies with subnanomolar affinity to tenofovir for monitoring adherence to antiretroviral therapies: From hapten synthesis to prototype development. *Journal of Materials Chemistry B*, *8*(45), 10439–10449. <https://doi.org/10.1039/d0tb01791d>
- Chatterjee, S., & Mukhopadhyay, S. (2022). Recent advances of lateral flow immunoassay components as “point of need .” *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, *43*(6), 579–604. <https://doi.org/10.1080/15321819.2022.2122063>
- Chimeno Zoth, S., & Taboga, O. (2006). Multiple recombinant ELISA for the detection of bovine viral diarrhoea virus antibodies in cattle sera. *Journal of Virological Methods*, *138*(1–2), 99–108. <https://doi.org/10.1016/J.JVIROMET.2006.07.025>
- Chiu, M. L., Goulet, D. R., Teplyakov, A., & Gilliland, G. L. (2019). Antibody structure and function: The basis for engineering therapeutics. *Antibodies*, *8*(4). <https://doi.org/10.3390/antib8040055>
- Chiu, M. L., Lawi, W., Snyder, S. T., Wong, P. K., Liao, J. C., & Gau, V. (2010). Matrix Effects-A Challenge Toward Automation of Molecular Analysis. *JALA - Journal of the Association for Laboratory Automation*, *15*(3), 233–242. <https://doi.org/10.1016/j.jala.2010.02.001>
- Choi, D. H., Lee, S. K., Oh, Y. K., Bae, B. W., Lee, S. D., Kim, S., Shin, Y. B., & Kim, M. G. (2010). A dual gold nanoparticle conjugate-based lateral flow assay (LFA) method for the analysis of troponin I. *Biosensors and Bioelectronics*, *25*(8), 1999–2002. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.01.019>
- Choi, K. H., Gallei, A., Becher, P., & Rossmann, M. G. (2006). The Structure of Bovine Viral Diarrhea Virus RNA-Dependent RNA Polymerase and Its Amino-Terminal Domain. *Structure*, *14*(7), 1107–1113. <https://doi.org/10.1016/j.str.2006.05.020>
- Cvak, B., Pum, D., Molinelli, A., & Krska, R. (2012). Synthesis and characterization of colloidal gold particles as labels for antibodies as used in lateral flow devices. *Analyst*, *137*(8), 1882–1887. <https://doi.org/10.1039/c2an16108g>
- da Silva, M. C., Schaefer, R., Gava, D., Souza, C. K., da Silva Vaz, I., Bastos, A. P., & Venancio, E. J. (2018). Production and application of anti-nucleoprotein IgY antibodies for influenza A virus detection in swine. *Journal of Immunological Methods*, *461*, 100–105. <https://doi.org/10.1016/J.JIM.2018.06.023>

- Dávalos-Pantoja, L., Ortega-Vinuesa, J. L., Bastos-González, D., & Hidalgo-Álvarez, R. (2012). *A comparative study between the adsorption of IgY and IgG on latex particles*. <https://doi.org/10.1163/156856200743931>
- de Faria, L. S., de Souza, D. L. N., Ribeiro, R. P., de Sousa, J. E. N., Borges, I. P., Ávila, V. M. R., Ferreira-Júnior, Á., Goulart, L. R., & Costa-Cruz, J. M. (2019). Highly specific and sensitive anti-*Strongyloides venezuelensis* IgY antibodies applied to the human strongyloidiasis immunodiagnosis. *Parasitology International*, 72(May), 101933. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2019.101933>
- de Jesus, B. A. P., Echeverri, L. M. S., Magalhães, M. de L. B., & Silva, G. F. da. (2023). Generation and characterization of avian IgY antibodies for detecting beta-casein A1 in bovine milk. *Analytical Biochemistry*, 678(July), 3–7. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2023.115283>
- Di Nardo, F., Chiarello, M., Cavalera, S., Baggiani, C., & Anfossi, L. (2021). Ten years of lateral flow immunoassay technique applications: Trends, challenges and future perspectives. *Sensors*, 21(15). <https://doi.org/10.3390/s21155185>
- Donis, R. O. (1995). Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus and its interactions with the host. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 11(3), 393–423. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30459-X](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30459-X)
- Donoso, A., Inostroza, F., Celedón, M., & Pizarro-Lucero, J. (2018). Genetic diversity of Bovine Viral Diarrhoea Virus from cattle in Chile between 2003 and 2007. *BMC Veterinary Research*, 14(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1641-7>
- Doria-Rose, N. A., & Joyce, M. G. (2015). Strategies to guide the antibody affinity maturation process. *Current Opinion in Virology*, 11(301), 137–147. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.04.002>
- Dubovi, E. J. (2013). Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhoea virus. *Biologicals*, 41(1), 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.06.004>
- Edmondson, M. A., Givens, M. D., Walz, P. H., Gard, J. A., Stringfellow, D. A., & Carson, R. L. (2007). Comparison of tests for detection of bovine viral diarrhoea virus in diagnostic samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 19(4), 376–381. <https://doi.org/10.1177/104063870701900406>
- Fan, W., Sun, S., Zhang, N., Zhang, Y., Jiao, P., Wang, J., Gao, G. F., Liu, W., Bi, Y., & Yang, L. (2022). Nasal delivery of thermostable and broadly neutralizing antibodies protects mice against SARS-CoV-2 infection. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2022 7:1, 7(1), 1–4. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00911-5>

Fetzer, C., Tews, B. A., & Meyers, G. (2005). The Carboxy-Terminal Sequence of the Pestivirus Glycoprotein Erns Represents an Unusual Type of Membrane Anchor. *Journal of Virology*, *79*(18), 11901–11913.
<https://doi.org/10.1128/jvi.79.18.11901-11913.2005>

Fink, A. L., Williams, K. L., Harris, E., Alvine, T. D., Henderson, T., Schiltz, J., Nilles, M. L., & Bradley, D. S. (2017). Dengue virus specific IgY provides protection following lethal dengue virus challenge and is neutralizing in the absence of inducing antibody dependent enhancement. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *11*(7), e0005721.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005721>

Gehin, J. E., Klaasen, R. A., Norli, E. S., Warren, D. J., Syversen, S. W., Goll, G. L., Bjørø, T., Kvien, T. K., Mjaavatten, M. D., & Bolstad, N. (2021). Rheumatoid factor and falsely elevated results in commercial immunoassays: data from an early arthritis cohort. *Rheumatology International*, *41*(9), 1657–1665.
<https://doi.org/10.1007/s00296-021-04865-9>

Ghazal, K., Brabant, S., Prie, D., & Piketty, M. L. (2021). Hormone immunoassay interference: A 2021 update. *Annals of Laboratory Medicine*, *42*(1), 3–23. <https://doi.org/10.3343/ALM.2022.42.1.3>

Gil, L. H. V. G., Ansari, I. H., Vassilev, V., Liang, D., Lai, V. C. H., Zhong, W., Hong, Z., Dubovi, E. J., & Donis, R. O. (2006). The Amino-Terminal Domain of Bovine Viral Diarrhea Virus Npro Protein Is Necessary for Alpha/Beta Interferon Antagonism. *Journal of Virology*, *80*(2), 900–911.
<https://doi.org/10.1128/jvi.80.2.900-911.2006>

Givens, M. D., & Newcomer, B. W. (2015). Perspective on BVDV control programs. *Animal Health Research Reviews*, *16*(1), 78–82.
<https://doi.org/10.1017/S1466252315000043>

Grego, E., Uslenghi, F., Strasser, M., Luzzago, C., Frigerio, M., Peletto, S., & Rosati, S. (2007). Development and application of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine viral diarrhea antibody based on Erns glycoprotein expressed in a baculovirus system. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *19*(1), 21–27.
<https://doi.org/10.1177/104063870701900104>

Griffiths, A. D., Williams, S. C., Hartley, O., Tomlinson, I. M., Waterhouse, P., Crosby, W. L., Kontermann, R. E., Jones, P. T., Low, N. M., John Allison, T., Prospero, T. D., Hoogenboom, H. R., Nissim, A., Cox, J. P. L., Harrison, J. L., Zaccolo, M., Gherardi, E., & Winter, G. (1994). Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *EMBO Journal*, *13*(14), 3245–3260. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06626.x>

Grooms, D. L. (2004). Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhea virus. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, *20*(1), 5–19. <https://doi.org/10.1016/J.CVFA.2003.11.006>

Grooms, D. L., Brock, K. V., Bolin, S. R., Grotelueschen, D. M., & Cortese, V. S. (2014). Effect of constant exposure to cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus on morbidity and mortality rates and performance of feedlot cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *244*(2), 212–224. <https://doi.org/10.2460/JAVMA.244.2.212>

H Michael Shepard, A. G. L. P. , B. C. D. T. C. and M. F. (2017). Developments in therapy with monoclonal antibodies and. *Clinical Medicine*, *17*(3), 220–232.

Harpaz, D., Eltzov, E., Axelrod, T., Marks, R. S., & Tok, A. I. Y. (2020). Membrane type comparison and modification to modulate sample flow in paper diagnostics. *Biochemical Engineering Journal*, *155*(October 2019). <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107483>

He, X., Hao, T., Geng, H., Li, S., Ran, C., Huo, M., & Shen, Y. (2023). Sensitization Strategies of Lateral Flow Immunochromatography for Gold Modified Nanomaterials in Biosensor Development. *International Journal of Nanomedicine*, *18*, 7847–7863. <https://doi.org/10.2147/IJN.S436379>

Hilbe, M., Stalder, H., Peterhans, E., Haessig, M., Nussbaumer, M., Egli, C., Schelp, C., Zlinszky, K., & Ehrensperger, F. (2007). Comparison of Five Diagnostic Methods for Detecting Bovine Viral Diarrhea Virus Infection in Calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *19*(1), 28–34. <https://doi.org/10.1177/104063870701900105>

Hilton, L., Moganeradj, K., Zhang, G., Chen, Y.-H., Randall, R. E., McCauley, J. W., & Goodbourn, S. (2006). The NPro Product of Bovine Viral Diarrhea Virus Inhibits DNA Binding by Interferon Regulatory Factor 3 and Targets It for Proteasomal Degradation. *Journal of Virology*, *80*(23), 11723–11732. <https://doi.org/10.1128/jvi.01145-06>

Huang, X., & Ahn, D. U. (2019). How Can the Value and Use of Egg Yolk Be Increased? *Journal of Food Science*, *84*(2), 205–212. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14430>

Hugues, F., Cabezas, I., Garigliany, M., Rivas, F., Casanova, T., González, E. E., Sánchez, O., Castillo, R., Parra, N. C., Inostroza-Michael, O., Moreno, L., Hernández, C. E., & Toledo, J. R. (2023). First report of bovine viral diarrhoea virus subgenotypes 1d and 1e in southern Chile. *Virology Journal*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12985-023-02170-4>

Iqbal, M., Flick-Smith, H., & McCauley, J. W. (2000). Interactions of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein E(rns) with cell surface glycosaminoglycans. *Journal of General Virology*, 81(2), 451–459. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-2-451>

Iqbal, M., Poole, E., Goodbourn, S., & McCauley, J. W. (2004). Role for bovine viral diarrhoea virus Erns glycoprotein in the control of activation of beta interferon by double-stranded RNA. *Journal of Virology*, 78(1), 136–145. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.1.136-145.2004>

Jen, S., Ávila, R. V., Júnior Á, F., Costa-Cruz, J., Lopes, C., de Faria, L., de Sousa, J., Borges, I., Ribeiro, R., Bueno, L., Rodrigues Ávila, V., & Ferreira Júnior, Á. (2019). *Anti-Ascaris suum immunoglobulin Y as a novel biotechnological tool for the diagnosis of human ascariasis*. <https://doi.org/10.1017/S0022149X19000701>

Karlsson, M., Kollberg, H., & Larsson, A. (2004). Chicken IgY: utilizing the evolutionary advantage. *World's Poultry Science Journal*, 60(3), 341–348. <https://doi.org/10.1079/wps200422>

Khlebtsov, B. N., Tumskiy, R. S., Burov, A. M., Pylaev, T. E., & Khlebtsov, N. G. (2019). *Quantifying the Numbers of Gold Nanoparticles in the Test Zone of Lateral Flow Immunoassay Strips*. <https://doi.org/10.1021/acsanm.9b00956>

Khodakaram-Tafti, A., & Farjanikish, G. H. (2017). Persistent bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in cattle herds. In *Iranian Journal of Veterinary Research* (Vol. 18, Issue 3, pp. 154–163). Shiraz University. <https://doi.org/10.22099/ijvr.2017.4190>

Kim, J. P., Yun, H., Kim, E. J., Kim, Y. G., Lee, C. S., Ko, B. J., Kim, B. G., & Jeong, H. J. (2023). Generation of a novel monoclonal antibody against inflammatory biomarker S100A8 using hybridoma technology. *Biotechnology Letters*, 45(5–6), 589–600. <https://doi.org/10.1007/s10529-023-03364-0>

Kim, J., Shin, M. S., Shin, J., Kim, H. M., Pham, X. H., Park, S. M., Kim, D. E., Kim, Y. J., & Jun, B. H. (2023). Recent Trends in Lateral Flow Immunoassays with Optical Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(11). <https://doi.org/10.3390/ijms24119600>

- Koczula, K. M., & Gallotta, A. (2016). Lateral flow assays. *Essays in Biochemistry*, *60*(1), 111–120. <https://doi.org/10.1042/EBC20150012>
- Köhler, G., & Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/256495a0>
- Kovacs-Nolan, J., & Mine, Y. (2012). Egg Yolk Antibodies for Passive Immunity. *Annu. Rev. Food Sci. Technol*, *3*, 163–182. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101137>
- Krey, T., Bontems, F., Vonrhein, C., Vaney, M.-C., Bricogne, G., Rüménapf, T., & Rey, F. A. (2012). Crystal Structure of the Pestivirus Envelope Glycoprotein Erns and Mechanistic Analysis of Its Ribonuclease Activity. *Structure*, *20*(5), 862–873. <https://doi.org/10.1016/J.STR.2012.03.018>
- Lackner, T., Müller, A., Pankraz, A., Becher, P., Thiel, H.-J., Gorbalenya, A. E., & Tautz, N. (2004). Temporal Modulation of an Autoprotease Is Crucial for Replication and Pathogenicity of an RNA Virus. *Journal of Virology*, *78*(19), 10765. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.19.10765-10775.2004>
- Lai, W., Xiong, Z., Huang, Y., Su, F., Zhang, G., Huang, Z., Peng, J., & Liu, D. (2019). Gold nanoflowers labelled lateral flow assay integrated with smartphone for highly sensitive detection of clenbuterol in swine urine. <https://doi.org/10.1080/09540105.2019.1684451>, *30*(1), 1225–1238. <https://doi.org/10.1080/09540105.2019.1684451>
- Land, K. J., Boeras, D. I., Chen, X. S., Ramsay, A. R., & Peeling, R. W. (2019). REASSURED diagnostics to inform disease control strategies, strengthen health systems and improve patient outcomes. *Nature Microbiology*, *4*(1), 46–54. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0295-3>
- Larsson, A., Campbell, A., & Eriksson, M. (2022). Chicken antibodies are highly suitable for particle enhanced turbidimetric assays. *Frontiers in Immunology*, *13*(October), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1016781>
- Lee, L., Samardzic, K., Wallach, M., Frumkin, L. R., & Mochly-Rosen, D. (2021). Immunoglobulin Y for Potential Diagnostic and Therapeutic Applications in Infectious Diseases. *Frontiers in Immunology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.696003>
- Li, G., Li, Q., Wang, X., Liu, X., Zhang, Y., Li, R., Guo, J., & Zhang, G. (2023). Lateral flow immunoassays for antigens, antibodies and haptens detection. *International Journal of Biological Macromolecules*, *242*(January). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125186>

- Li, G., Wang, A., Chen, Y., Sun, Y., Du, Y., Wang, X., Ding, P., Jia, R., Wang, Y., & Zhang, G. (2021). Development of a Colloidal Gold-Based Immunochromatographic Strip for Rapid Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Spike Protein. *Frontiers in Immunology*, 12(March), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.635677>
- Li, G., Wang, X., Li, Q., Yang, J., Liu, X., Qi, W., Guo, J., Deng, R., & Zhang, G. (2021). Development of an immunochromatographic strip for rapid detection of H7 subtype avian influenza viruses. *Virology Journal*, 18(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12985-021-01537-9>
- Li, Y., Liu, L., Kuang, H., & Xu, C. (2020). Preparing monoclonal antibodies and developing immunochromatographic strips for paraquat determination in water. *Food Chemistry*, 311(November 2019), 125897. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125897>
- Li, Z., Chen, H., Feng, S., Liu, K., & Wang, P. (2020). Development and Clinical Validation of a Sensitive Lateral Flow Assay for Rapid Urine Fentanyl Screening in the Emergency Department. *Clinical Chemistry*, 66(2), 324–332. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvz023>
- Liebler-Tenorio, E. M., Ridpath, J. F., & Neill, J. D. (2004). Distribution of viral antigen and tissue lesions in persistent and acute infection with the homologous strain of noncytopathic bovine viral diarrhea virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 16(5), 388–396. <https://doi.org/10.1177/104063870401600504>
- Lipman, N. S., Jackson, L. R., Trudel, L. J., & Weis-Garcia, F. (2005). Monoclonal versus polyclonal antibodies: Distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR Journal*, 46(3), 258–267. <https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.258>
- Liu, R., & Ko, C. C. (2023). Molecularly Imprinted Polymer-Based Luminescent Chemosensors. *Biosensors*, 13(2). <https://doi.org/10.3390/bios13020295>
- Liu, Y., Zhan, L., Qin, Z., Sackrison, J., & Bischof, J. C. (2021). Ultrasensitive and Highly Specific Lateral Flow Assays for Point-of-Care Diagnosis. *ACS Nano*, 15(3), 3593–3611. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.0c10035>
- Lopes, C. A., De Faria, L. S., De Sousa, J. E. N., Borges, I. P., Ribeiro, R. P., Bueno, L. L., Rodrigues Avila, V. M., Ferreira Junior, A., & Costa-Cruz, J. M. (2020). Anti-*Ascaris suum* immunoglobulin y as a novel biotechnological tool for the diagnosis of human ascariasis. *Journal of Helminthology*, 94. <https://doi.org/10.1017/S0022149X19000701>

Lou, S., Ye, J. Y., Li, K. Q., & Wu, A. (2012). A gold nanoparticle-based immunochromatographic assay: The influence of nanoparticulate size. *Analyst*, 137(5), 1174–1181. <https://doi.org/10.1039/c2an15844b>

Łupicka-Słowik, A., Grzywa, R., Leporowska, E., Procyk, D., Oleksyszyn, J., & Sieńczyk, M. (2019). Development and Evaluation of an Immunoglobulin Y-Based ELISA for Measuring Prostate Specific Antigen in Human Serum. *Annals of Laboratory Medicine*, 39(4), 373–380. <https://doi.org/10.3343/ALM.2019.39.4.373>

Lütkecosmann, S., Faupel, T., Porstmann, S., Porstmann, T., Micheel, B., & Hanack, K. (2019). A cross-reactive monoclonal antibody as universal detection antibody in autoantibody diagnostic assays. *Clinica Chimica Acta*, 499(September), 87–92. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.09.003>

Madera-contreras, A. M., Solano-texta, R., Cisneros-sarabia, A., Bautista-santos, I., Vences-velázquez, G., Vences-velázquez, A., & Cortés-sarabia, K. (2022). MethodsX Optimized method for the extraction of contaminant-free IgY antibodies from egg yolk using PEG 60 0 0. *MethodsX*, 9(October), 101874. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2022.101874>

Magkouras, I., Mätzener, P., Rümenapf, T., Peterhans, E., & Schweizer, M. (2008). RNase-dependent inhibition of extracellular, but not intracellular, dsRNA-induced interferon synthesis by Erns of pestiviruses. *Journal of General Virology*, 89(10), 2501–2506. <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/003749-0>

Marschik, T., Obritzhauser, W., Wagner, P., Richter, V., Mayerhofer, M., Egger-Danner, C., Käsbohrer, A., & Pinior, B. (2018). A cost-benefit analysis and the potential trade effects of the bovine viral diarrhoea eradication programme in Styria, Austria. *Veterinary Journal*, 231, 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.11.010>

Marzocca, M. P., Seki, C., Giambiagi, S. M., Robiolo, B., Schauer, R., Dus Santos, M. J., Scodeller, E. A., La Torre, J. L., Wigdorovitz, A., & Grigera, P. R. (2007). Truncated E2 of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) expressed in *Drosophila melanogaster* cells: A candidate antigen for a BVDV ELISA. *Journal of Virological Methods*, 144(1–2), 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.03.023>

Mathapati, B. S., Mishra, N., Rajukumar, K., Nema, R. K., Behera, S. P., & Dubey, S. C. (2010). Entry of bovine viral diarrhoea virus into ovine cells occurs through clathrin-dependent endocytosis and low pH-dependent fusion. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, 46(5), 403–407. <https://doi.org/10.1007/s11626-009-9263-9>

Maurer, K., Krey, T., Moennig, V., Thiel, H.-J., & Rümenapf, T. (2004). CD46 Is a Cellular Receptor for Bovine Viral Diarrhea Virus. *Journal of Virology*, *78*(4), 1792–1799. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.4.1792-1799.2004>

Mdluli, P., Tetyana, P., Sosibo, N., van der Walt, H., Mlambo, M., Skepu, A., & Tshikhudo, R. (2014). Gold nanoparticle based Tuberculosis immunochromatographic assay: The quantitative ESE Quanti analysis of the intensity of test and control lines. *Biosensors and Bioelectronics*, *54*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.10.019>

Meyers, G., Ege, A., Fetzer, C., Von Freyburg, M., Knut, ‡, Carr, V., Prentice, H., Charleston, B., & Schürmann, E.-M. (2007). Bovine Viral Diarrhea Virus: Prevention of Persistent Fetal Infection by a Combination of Two Mutations Affecting E rns RNase and N pro Protease. *JOURNAL OF VIROLOGY*, *81*(7), 3327–3338. <https://doi.org/10.1128/JVI.02372-06>

Michael, A., Meenatchisundaram, S., Parameswari, G., Subbraj, T., Selvakumaran, R., & Ramalingam, S. (2010). Chicken Egg Yolk Antibodies (IgY) as an Alternative to Mammalian Antibodies. *Indian Journal of Science and Technology*, *3*(4), 468–474. <https://doi.org/10.17485/IJST/2010/V3I4/29741>

Minic, R., & Zivkovic, I. (2020). Optimization, Validation and Standardization of ELISA. *Norovirus*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.94338>

Mirica, A. C., Stan, D., Chelcea, I. C., Mihailescu, C. M., Ofiteru, A., & Bocancia-Mateescu, L. A. (2022). Latest Trends in Lateral Flow Immunoassay (LFIA) Detection Labels and Conjugation Process. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *10*(June), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.922772>

Mitra, S., & Tomar, P. C. (2021a). Hybridoma technology; advancements, clinical significance, and future aspects. *Journal of Genetic Engineering & Biotechnology*, *19*(1), 159. <https://doi.org/10.1186/S43141-021-00264-6>

Mitra, S., & Tomar, P. C. (2021b). Hybridoma technology; advancements, clinical significance, and future aspects. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, *19*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S43141-021-00264-6/FIGURES/7>

Moennig, V., & Becher, P. (2018). Control of Bovine Viral Diarrhea. *Pathogens*, *7*(1), 29. <https://doi.org/10.3390/pathogens7010029>

Murray, L. P., Govindan, R., Mora, A. C., Munro, J. B., & Mace, C. R. (2021). Antibody affinity as a driver of signal generation in a paper-based immunoassay for Ebola virus surveillance. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *413*(14), 3695–3706. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03317-4>

Neill, J. D. (2013). Molecular biology of bovine viral diarrhea virus. *Biologicals*, 41(1), 2–7. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.07.002>

Nilsson, E., Kollberg, H., Johannesson, M., Wejåker, P. E., Carlander, D., & Larsson, A. (2007). More Than 10 Years' Continuous Oral Treatment with Specific Immunoglobulin Y for the Prevention of *Pseudomonas aeruginosa* Infections: A Case Report. <https://Home.Liebertpub.Com/Jmf>, 10(2), 375–378. <https://doi.org/10.1089/JMF.2006.214>

Nogarol, C., Decaro, N., Bertolotti, L., Colitti, B., Iotti, B., Petrini, S., Lucente, M. S., Elia, G., Perona, G., Profiti, M., Buonavoglia, C., & Rosati, S. (2017). Pestivirus infection in cattle dairy farms: E2 glycoprotein ELISA reveals the presence of bovine viral diarrhea virus type 2 in northwestern Italy. *BMC Veterinary Research*, 13(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1305-z>

Nutt, S. L., Hodgkin, P. D., Tarlinton, D. M., & Corcoran, L. M. (2015). The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nature Reviews Immunology*, 15(3), 160–171. <https://doi.org/10.1038/nri3795>

Ochwo, S., Perez, A. M., & Pérez Aguirreburualde, M. S. (2023). Beyond accuracy: leveraging ASSURED criteria for field evaluation of point-of-care tests for food animal diseases. *Frontiers in Veterinary Science*, 10(August). <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1239111>

Oguejiofor, C. F., Thomas, C., Cheng, Z., & Wathes, D. C. (2019). Mechanisms linking bovine viral diarrhea virus (BVDV) infection with infertility in cattle. *Animal Health Research Reviews*. <https://doi.org/10.1017/S1466252319000057>

Omari, K. El, Iourin, O., Harlos, K., Grimes, J. M., & Stuart, D. I. (2013). Structure of a Pestivirus Envelope Glycoprotein E2 Clarifies Its Role in Cell Entry. *CellReports*, 3, 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.12.001>

Otoo, J. A., & Schlappi, T. S. (2022). REASSURED Multiplex Diagnostics: A Critical Review and Forecast. *Biosensors*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/bios12020124>

Parolo, C., Sena-Torralba, A., Bergua, J. F., Calucho, E., Fuentes-Chust, C., Hu, L., Rivas, L., Álvarez-Diduk, R., Nguyen, E. P., Cinti, S., Quesada-González, D., & Merkoçi, A. (2020). Tutorial: design and fabrication of nanoparticle-based lateral-flow immunoassays. *Nature Protocols* 2020 15:12, 15(12), 3788–3816. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0357-x>

Parray, H. A., Shukla, S., Samal, S., Shrivastava, T., Ahmed, S., Sharma, C., & Kumar, R. (2020). Hybridoma technology a versatile method for isolation of monoclonal antibodies, its applicability across species, limitations, advancement

and future perspectives. *International Immunopharmacology*, 85(April), 106639. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106639>

Pauly, D., Dorner, M., Zhang, X., Hlinak, A., Dorner, B., & Schade, R. (2009). Monitoring of laying capacity, immunoglobulin Y concentration, and antibody titer development in chickens immunized with ricin and botulinum toxins over a two-year period. *Poultry Science*, 88(2), 281–290. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00323>

Peeling, R. W., Holmes, K. K., Mabey, D., & Ronald, A. (2006). Rapid tests for sexually transmitted infections (STIs): The way forward. *Sexually Transmitted Infections*, 82(SUPPL. 5), 1–6. <https://doi.org/10.1136/sti.2006.024265>

Pereira, E. P. V., van Tilburg, M. F., Florean, E. O. P. T., & Guedes, M. I. F. (2019). Egg yolk antibodies (IgY) and their applications in human and veterinary health: A review. *International Immunopharmacology*, 73, 293–303. <https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2019.05.015>

Peterhans, E., Jungi, T. W., & Schweizer, M. (2003). BVDV and innate immunity. *Biologicals*, 31(2), 107–112. [https://doi.org/10.1016/S1045-1056\(03\)00024-1](https://doi.org/10.1016/S1045-1056(03)00024-1)

Peterhans, E., & Schweizer, M. (2013). BVDV: A pestivirus inducing tolerance of the innate immune response. *Biologicals*, 41(1), 39–51. <https://doi.org/10.1016/J.BIOLOGICALS.2012.07.006>

Pidre, M. L., Arrías, P. N., Amorós Morales, L. C., & Romanowski, V. (2023). The Magic Staff: A Comprehensive Overview of Baculovirus-Based Technologies Applied to Human and Animal Health. *Viruses*, 15(1). <https://doi.org/10.3390/v15010080>

Pizarro-Guajardo, M., Díaz-González, F., Álvarez-Lobos, M., & Paredes-Sabja, D. (2017). Characterization of chicken IgY specific to *Clostridium difficile* R20291 spores and the effect of oral administration in mouse models of initiation and recurrent disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(AUG), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00365>

Pizarro-Lucero, J., Celedón, M. O., Aguilera, M., & de Calisto, A. (2006). Molecular characterization of pestiviruses isolated from bovines in Chile. *Veterinary Microbiology*, 115(1–3), 208–217. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.02.009>

Polson, A., von Wechmar, M. B., & van Regenmortel, M. H. V. (1980). Isolation of viral igy antibodies from yolks of immunized hens. *Immunological Investigations*, 9(5), 475–493. <https://doi.org/10.3109/08820138009066010>

Porte, L., Legarraga, P., Vollrath, V., Aguilera, X., Munita, J. M., Araos, R., Pizarro, G., Vial, P., Iruretagoyena, M., Dittrich, S., & Weitzel, T. (2020). Evaluation of a novel antigen-based rapid detection test for the diagnosis of SARS-CoV-2 in respiratory samples. *International Journal of Infectious Diseases*, *99*, 328–333. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.05.098>

Postel, A., Austermann-Busch, S., Petrov, A., Moennig, V., & Becher, P. (2018). Epidemiology, diagnosis and control of classical swine fever: Recent developments and future challenges. *Transboundary and Emerging Diseases*, *65*, 248–261. <https://doi.org/10.1111/tbed.12676>

Prabakaran, P., & Dimitrov, D. S. (2017). Human Antibody Structure and Function. In *Protein Therapeutics* (pp. 51–84). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9783527699124.ch3>

Qi, S., Wo, L., Sun, C., Zhang, J., Pang, Q., & Yin, X. (2022). Host Cell Receptors Implicated in the Cellular Tropism of BVDV. *Viruses*, *14*(10), 1–13. <https://doi.org/10.3390/v14102302>

Qriouet, Z., Cherrah, Y., Sefrioui, H., & Qmichou, Z. (2021). Monoclonal antibodies application in lateral flow immunochromatographic assays for drugs of abuse detection. *Molecules*, *26*(4). <https://doi.org/10.3390/molecules26041058>

Radford, K. M., Cavegn, C., Bertrand, M., Bernard, A. R., Reid, S., & Greenfield, P. F. (1997). The indirect effects of multiplicity of infection on baculovirus expressed proteins in insect cells: Secreted and non-secreted products. *Cytotechnology*, *24*(1), 73–81. <https://doi.org/10.1023/A:1007962903435>

Rathanaswami, P., Roalstad, S., Roskos, L., Su, Q. J., Lackie, S., & Babcook, J. (2005). Demonstration of an in vivo generated sub-picomolar affinity fully human monoclonal antibody to interleukin-8. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *334*(4), 1004–1013. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.07.002>

Reza Seyfi Abad Shapouri, M., Ekhtelat, M., Ghorbanpoor Najaf Abadi, M., Mahmoodi Koohi, P., & Lotfi, M. (2015). Production of Monoclonal Antibody Against Recombinant Polypeptide From the Erns Coding Region of the Bovine Viral Diarrhea Virus. *Jundishapur J Microbiol*, *8*(12), 26727. <https://doi.org/10.5812/jjm.26727>

Richter, V., Lebl, K., Baumgartner, W., Obritzhauser, W., Käsbohrer, A., & Pinior, B. (2017). A systematic worldwide review of the direct monetary losses in cattle due to bovine viral diarrhoea virus infection. *Veterinary Journal*, *220*, 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.01.005>

Ridpath, J. (2010). The Contribution of Infections with Bovine Viral Diarrhea Viruses to Bovine Respiratory Disease. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 26(2), 335–348.
<https://doi.org/10.1016/J.CVFA.2010.04.003>

Ridpath, J. F. (2005). Practical significance of heterogeneity among BVDV strains: Impact of biotype and genotype on U.S. control programs. *Preventive Veterinary Medicine*, 72(1–2), 17–30.
<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.08.003>

Ridpath, J. F. (2008). Bovine Viral Diarrhea Virus. *Encyclopedia of Virology*, 374–380. <https://doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00354-X>

Riedel, C., Chen, H. W., Ursula, R., Lamp, B., Laketa, V., & Rügenapf, T. (2020). Real Time Analysis of Bovine Viral Diarrhea Virus. *Viruses*.

Rikula, U., Nuotio, L., Aaltonen, T., & Ruoho, O. (2005). Bovine viral diarrhoea virus control in Finland 1998–2004. *Preventive Veterinary Medicine*, 72(1–2), 139–142. <https://doi.org/10.1016/J.PREVETMED.2005.08.010>

Rodríguez, M. O., Covián, L. B., García, A. C., & Blanco-López, M. C. (2016). Silver and gold enhancement methods for lateral flow immunoassays. *Talanta*, 148, 272–278. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.10.068>

Ronecker, S., Zimmer, G., Herrler, G., Greiser-Wilke, I., & Grummer, B. (2008). Formation of bovine viral diarrhoea virus E1-E2 heterodimers is essential for virus entry and depends on charged residues in the transmembrane domains. *Journal of General Virology*, 89(9), 2114–2121.
<https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/001792-0>

Ruiz, G., Tripathi, K., Okyem, S., & Driskell, J. D. (2019). PH Impacts the Orientation of Antibody Adsorbed onto Gold Nanoparticles. *Bioconjugate Chemistry*, 30(4), 1182–1191. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00123>

Rügenapf, T., Unger, G., Strauss, J. H., & Thiel, H. J. (1993). Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. *Journal of Virology*, 67(6), 3288–3294.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8388499>

Sanches, R. F., dos Santos Ferraro, A. C. N., Marroni, F. E. C., & Venancio, E. J. (2022). Synergistic activity between beta-lactams and ige antibodies against *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *Molecular Immunology*, 148(January), 1–5.
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2022.05.010>

Simmonds, P., Becher, P., Bukh, J., Gould, E. A., Meyers, G., Monath, T., Muerhoff, S., Pletnev, A., Rico-Hesse, R., Smith, D. B., & Stapleton, J. T. (2017). ICTV virus taxonomy profile: Flaviviridae. *Journal of General Virology*, 98(1), 2–3. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000672>

Soh, J. H., Chan, H. M., & Ying, J. Y. (2020). Strategies for developing sensitive and specific nanoparticle-based lateral flow assays as point-of-care diagnostic device. *Nano Today*, 30, 100831. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2019.100831>

Spillner, E., Braren, I., Greunke, K., Seismann, H., Blank, S., & du Plessis, D. (2012). Avian IgY antibodies and their recombinant equivalents in research, diagnostics and therapy. *Biologicals*, 40(5), 313–322. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.05.003>

Ståhl, K., & Alenius, S. (2011). BVDV control and eradication in Europe -an update. *Japanese Journal of Veterinary Research*, 60(SUPPL).

Sukumaran, A., Thomas, T., Thomas, R., & Elizabeth, R. (2021). Development and Troubleshooting in Lateral Flow Immunochromatography Assays. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 36(2), 208–212. <https://doi.org/10.1007/s12291-020-00887-5>

Syahrani, S., Hartati, Y. W., Yusuf, M., Kusumawardani, S., Wibawan, I. W. T., Arnafia, W., Sibit, G., & Subroto, T. (2021). Development of lateral flow assay based on anti-IBDV IgY for the rapid detection of Gumboro disease in poultry. *Journal of Virological Methods*, 291(August 2020), 114065. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114065>

Taranova, N. A., Byzova, N. A., Pridvorova, S. M., Zherdev, A. V., & Dzantiev, B. B. (2021). Comparative assessment of different gold nanoflowers as labels for lateral flow immunosensors. *Sensors*, 21(21). <https://doi.org/10.3390/s21217098>

Tautz, N., Tews, B. A., & Meyers, G. (2015). The Molecular Biology of Pestiviruses. In *Advances in Virus Research* (1st ed., Vol. 93). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2015.03.002>

Tesar, D. B., Cheung, E. J., & Bjorkman, P. J. (2008). The chicken yolk sac IgY receptor, a mammalian mannose receptor family member, transcytoses IgY across polarized epithelial cells. *Molecular Biology of the Cell*, 19(4), 1587–1593. <https://doi.org/10.1091/mbc.E07-09-0972>

Thirumalai, D., Visaga Ambi, S., Vieira-Pires, R. S., Xiaoying, Z., Sekaran, S., & Krishnan, U. (2019). Chicken egg yolk antibody (IgY) as diagnostics and therapeutics in parasitic infections – A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, *136*, 755–763.
<https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2019.06.118>

Thomann, B., Tschopp, A., Magouras, I., Meylan, M., Schüpbach-Regula, G., & Häsler, B. (2017). Economic evaluation of the eradication program for bovine viral diarrhoea in the Swiss dairy sector. *Preventive Veterinary Medicine*, *145*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/J.PREVETMED.2017.05.020>

Thomsen, K., Christophersen, L., Lerche, C. J., Holmgaard, D. B., Calum, H., Høiby, N., & Moser, C. (2021). Azithromycin potentiates avian IgY effect against *Pseudomonas aeruginosa* in a murine pulmonary infection model. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *57*(1), 106213.
<https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2020.106213>

Thu, H. M., Myat, T. W., Win, M. M., Thant, K. Z., Rahman, S., Umeda, K., Nguyen, S. Van, Icatlo, F. C., Higo-Moriguchi, K., Taniguchi, K., Tsuji, T., Oguma, K., Kim, S. J., Bae, H. S., Choi, H. J., & Choi, H. J. (2017). Chicken Egg Yolk Antibodies (IgY) for Prophylaxis and Treatment of Rotavirus Diarrhoea in Human and Animal Neonates: A Concise Review. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, *37*(1), 1–9.
<https://doi.org/10.5851/kosfa.2017.37.1.1>

Tini, M., Jewell, U. ., Camenisch, G., Chilov, D., & Gassmann, M. (2002). Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, *131*(3), 569–574. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(01\)00508-6](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(01)00508-6)

Üstün-Aytekin, Ö., Gürhan, I. D., Ohura, K., Imai, T., & Öngen, G. (2014). Monitoring of the effects of transfection with baculovirus on Sf9 cell line and expression of human dipeptidyl peptidase IV. *Cytotechnology*, *66*(1), 159–168.
<https://doi.org/10.1007/s10616-013-9549-3>

Valle, P. S., Skjerve, E., Martin, S. W., Larssen, R. B., Østerås, O., & Nyberg, O. (2005). Ten years of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) control in Norway: a cost-benefit analysis. *Preventive Veterinary Medicine*, *72*(1–2), 189–207.
<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.07.017>

- Vijayaraghavan, B., Xia, H., Harimoorthy, R., Liu, L., & Belák, S. (2012). Evaluation of envelope glycoprotein Erns of an atypical bovine pestivirus as antigen in a microsphere immunoassay for the detection of antibodies against bovine viral diarrhea virus 1 and atypical bovine pestivirus. *Journal of Virological Methods*, 185(2), 193–198. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.06.017>
- Vilcek, S., Durkovic, B., Kolesarova, M., & Paton, D. J. (2005). Genetic diversity of BVDV: Consequences for classification and molecular epidemiology. *Preventive Veterinary Medicine*, 72(1–2), 31–35. <https://doi.org/10.1016/J.PREVETMED.2005.08.004>
- Voges, H., Young, S., & Nash, M. (2006). *Direct adverse effects of persistent BVDv infection in dairy heifers—a retrospective case control study*. http://www.controlbvd.org.nz/sites/default/files/Direct_adverse_effects_of_persistent_BVDv_infection_in_dairy_heifers.pdf
- Wang, F.-I., Deng, M.-C., Huang, Y.-L., & Chang, C.-Y. (2015). Structures and Functions of Pestivirus Glycoproteins: Not Simply Surface Matters. *Viruses*, 7, 3506–3529. <https://doi.org/10.3390/v7072783>
- Wang, P., Li, J., Guo, L., Li, J., He, F., Zhang, H., & Chi, H. (2024). The Developments on Lateral Flow Immunochromatographic Assay for Food Safety in Recent 10 Years: A Review. *Chemosensors*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/chemosensors12060088>
- Wang, Y., & Pang, F. (2024). Diagnosis of bovine viral diarrhea virus: an overview of currently available methods. *Frontiers in Microbiology*, 15(April), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1370050>
- Wang, Z., Liu, M., Zhao, H., Wang, P., Ma, W., Zhang, Y., Wu, W., & Peng, C. (2021). Induction of robust and specific humoral and cellular immune responses by bovine viral diarrhea virus virus-like particles (BVDV-VLPs) engineered with baculovirus expression vector system. *Vaccines*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/vaccines9040350>
- Wang, Z., Zhao, J., Xu, X., Guo, L., Xu, L., Sun, M., Hu, S., Kuang, H., Xu, C., & Li, A. (2022). An Overview for the Nanoparticles-Based Quantitative Lateral Flow Assay. *Small Methods*, 6(1), 1–29. <https://doi.org/10.1002/smtd.202101143>
- Wark, K. L., & Hudson, P. J. (2006). Latest technologies for the enhancement of antibody affinity. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(5–6), 657–670. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.01.025>

Workman, A. M., Heaton, M. P., Vander Ley, B. L., Webster, D. A., Sherry, L., Bostrom, J. R., Larson, S., Kalbfleisch, T. S., Harhay, G. P., Jobman, E. E., Carlson, D. F., & Sonstegard, T. S. (2023). First gene-edited calf with reduced susceptibility to a major viral pathogen. *PNAS Nexus*, 2(5), 1–14. <https://doi.org/10.1093/pnasnexus/pgad125>

Xu, P., Li, J., Huang, X., Duan, H., Ji, Y., & Xiong, Y. (2016). Effect of the tip length of multi-branched AuNFs on the detection performance of immunochromatographic assays. *Analytical Methods*, 8(16), 3316–3324. <https://doi.org/10.1039/C5AY03274A>

Yitagesu, E., Jackson, W., Kebede, N., Smith, W., & Fentie, T. (2021). Prevalence of bovine abortion, calf mortality, and bovine viral diarrhoea virus (BVDV) persistently infected calves among pastoral, peri-urban, and mixed-crop livestock farms in central and Northwest Ethiopia. *BMC Veterinary Research*, 17(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S12917-021-02798-W/FIGURES/3>

Yokota, S. (2010). Preparation of colloidal gold particles and conjugation to protein A, IgG, F(ab')₂, and streptavidin. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 657, 109–119. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-783-9_8

Yue, X., Steeneveld, W., van der Voort, M., van Schaik, G., Vernooij, J. C. M., van Duijn, L., Veldhuis, A. M. B., & Hogeveen, H. (2021). The effect of bovine viral diarrhoea virus introduction on milk production of Dutch dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 104(2), 2074–2086. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18866>

Zeng, Q., Mao, X., Xu, H., Wang, S., & Liu, G. (2009). Quantitative Immunochromatographic Strip Biosensor for the Detection of Carcinoembryonic Antigen Tumor Biomarker in Human Plasma. *American Journal of Biomedical Sciences*, 1(1), 70–79. <https://doi.org/10.5099/aj090100070>

Zhai, Y., Meng, X., Li, L., Liu, Y., Xu, K., Zhao, C., Wang, J., Song, X., Li, J., & Jin, M. (2021). Rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* using magnetic nanobead-based immunoseparation and quantum dot-based immunofluorescence. *RSC Advances*, 11(61), 38638–38647. <https://doi.org/10.1039/D1RA07580B>

Zhang, L., Huang, Y., Wang, J., Rong, Y., Lai, W., Zhang, J., & Chen, T. (2015). Hierarchical flowerlike gold nanoparticles labeled immunochromatography test strip for highly sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Langmuir*, 31(19), 5537–5544. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b00592>

- Zhang, Q., He, D., Xu, L., Ge, S., Wang, J., & Zhang, X. (2020). Generation and evaluation of anti-mouse IgG IgY as secondary antibody. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 50(8), 788–793. <https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1737940>
- Zhang, W., Duan, H., Chen, R., Ma, T., Zeng, L., Leng, Y., & Xiong, Y. (2019). Effect of different-sized gold nanoflowers on the detection performance of immunochromatographic assay for human chorionic gonadotropin detection. *Talanta*, 194(August 2018), 604–610. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.10.080>
- Zhang, X., Calvert, R. A., Sutton, B. J., & Doré, K. A. (2017). IgY: a key isotype in antibody evolution. *Biological Reviews*, 92(4), 2144–2156. <https://doi.org/10.1111/brv.12325>
- Zhang, X., Diraviyam, T., Li, X., Yao, G., & Michael, A. (2016). Preparation of chicken IgY against recombinant E2 protein of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and development of ELISA and ICA for BVDV detection. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80(12), 2467–2472. <https://doi.org/10.1080/09168451.2016.1217144>
- Zhang, Y., Tan, W., Zhang, Y., Mao, H., Shi, S., Duan, L., Wang, H., & Yu, J. (2019). Ultrasensitive and selective detection of *Staphylococcus aureus* using a novel IgY-based colorimetric platform. *Biosensors and Bioelectronics*, 142(July), 111570. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111570>
- Zhong, Y., Chen, Y., Yao, L., Zhao, D., Zheng, L., Liu, G., Ye, Y., & Chen, W. (2016). Gold nanoparticles based lateral flow immunoassay with largely amplified sensitivity for rapid melamine screening. *Microchimica Acta*, 183(6), 1989–1994. <https://doi.org/10.1007/s00604-016-1812-9>
- Zitzmann, J., Sprick, G., Weidner, T., Schreiber, C., & Czermak, P. (2017). Process Optimization for Recombinant Protein Expression in Insect Cells. *New Insights into Cell Culture Technology*. <https://doi.org/10.5772/67849>
- Zürcher, C., Sauter, K.-S., Mathys, V., Wyss, F., & Schweizer, M. (2014). Prolonged activity of the pestiviral RNase Erns as an interferon antagonist after uptake by clathrin-mediated endocytosis. *Journal of Virology*, 88(13), 7235–7243. <https://doi.org/10.1128/JVI.00672-14>