

**Purificación y caracterización de las proteínas no capsidales del virus de la fiebre aftosa
y obtención de anticuerpos policlonales: Su implicación en el control de calidad de la
vacuna anti-aftosa.**



Tatiana María Garcés Parada

Universidad de Pamplona

Maestría biología molecular y biotecnología

Pamplona

2019

**Purificación y caracterización de las proteínas no capsidales del virus de la fiebre aftosa
y obtención de anticuerpos policlonales: Su implicación en el control de calidad de la
vacuna anti-aftosa.**

Tatiana Garcés Parada.

Director de trabajo de grado

PhD. Luis Fernando Arbeláez Ramírez.

**Proyecto de grado para optar al título de Magister en Biología molecular y
Biotecnología.**

Grupo de Investigación en Química.

Línea de Investigación: Proteómica

Financiado por Universidad de Pamplona-Limor de Colombia.

Universidad de Pamplona

Maestría biología molecular y biotecnología

Pamplona

2019

Agradecimientos.

Deseo expresar mi agradecimiento a todas las personas que desde distintos ámbitos hicieron posible la terminación de este trabajo de grado:

A mi director, el Doctor Luis Fernando Arbeláez Ramírez, por haberme brindado la oportunidad y la confianza para realizar mi trabajo de investigación en el laboratorio de Biomoléculas de la universidad de Pamplona.

A la empresa Limor de Colombia, por mostrar la problemática, apoyar esta investigación y ser colaboradores de muchos suministros.

A la Profesora Wlida Becerra, por orientarme en el área de inmunología.

A veterinario Denis por su ayuda en el momento de las inmunizaciones a los animalitos que se vacunaron en la finca villa marina propiedad de la Universidad de Pamplona.

A la profesora Gladis Montañez, por orientarme en la parte estadística y ser tan bella persona.

A mis estimados evaluadores, que con sus correcciones hicieron de esté un buen trabajo.

A mi querida Madre, mi hijita Isabel, mi esposo, por apoyarme en todo el proceso.

A mi abuelito Carlos que desde el cielo me iluminas.

Tabla de contenido

Índice de figuras	8
Índice de tablas	10
Abreviaturas y siglas	11
Información general del proyecto	14
Resumen	15
Abstract	16
1. Introducción	17
2. Planteamiento del problema y justificación	19
3. Marco teórico	22
3.1 Virus de la fiebre aftosa	22
3. 1. 1 Genoma del virus de la fiebre aftosa	22
3. 1. 2 Regiones no codificantes 5' (UTR _s)	22
3. 1. 3 Región codificante	24
3. 1. 4 Región 3' no codificante	27
3. 1. 5 Proteínas no capsidales	28
3. 1. 5. 1 Proteínas no capsidal 3B	28
3. 1. 5. 2 Proteínas no capsidal 3D.....	28
3. 1. 6 Ciclo de replicación viral	29
3. 2 La fiebre aftosa	31
3. 2. 1 Transmisión y sintomatología	31

3. 2. 2 Diagnóstico de la fiebre aftosa	33
3. 2. 2. 1 Detección viral	33
3. 2. 2. 2 Detección de anticuerpos contra proteínas capsidales del virus de la fiebre aftosa	33
3. 2. 2. 3 Detección de anticuerpos contra proteínas no capsidales del virus de la fiebre aftosa	34
3. 3 Control de la patogenia	35
3. 3. 1 Producción de la vacuna	36
3. 3. 2 Prueba de pureza a proteínas no capsidales	37
3. 4 Marco referencial	36
3. 4. 1 Fiebre aftosa en Colombia	36
3. 4. 2 Situación actual de fiebre aftosa en Colombia	39
3. 4. 3 Impacto económico	41
4. Objetivos	43
4. 1 Objetivo general	43
4. 2 Objetivos específicos	43
5. Materiales y métodos	44
5.1 Material biológico	44
5. 1. 1 Cultivo de virus VO1C y VA24C	44
5. 1. 2 Sobrenadante del concentrado con polietilenglicol	44
5. 2 Proceso de purificación de los antígenos de las proteínas no capsidales	44

5. 2. 1	Concentración, Diálisis, Cromatografía de intercambio aniónico	44
5. 2. 2	Electroforesis SDS-PAGE	45
5. 2. 3	Electroforesis bidimensional 2D	45
5. 2. 4	Secuenciación de las proteínas	46
5. 3	Immunización en cabras con el antígeno no capsidal	47
5. 3. 1	Obtención de suero hiperinmune	47
5. 3. 2	Purificación de anticuerpos policlonales	48
5. 3. 3	Inmunodifusión	49
5. 3. 4	Western blot	49
5. 4	ELISA.....	50
5. 4. 1	Sensibilización de placas para Elisa	50
5. 4. 2	Procedimiento Elisa (curva de calibración)	50
5. 4. 3	Evaluación del rango lineal de la curva	51
6.	Resultados	51
6. 1	Purificación serotipos A24 /cruzeiro (VA24C) en cultivo de virus (BHK-21)	51
6. 1. 1	Purificación serotipos O1 /campus en cultivo de virus (BHK-21)	55
6. 2	Monitoreo del sobrenadante del concentrado con PEG	56
6. 3	Caracterización proteína no capsidal 3D	57
6. 4	Inducción y purificación de anticuerpos policlonales	60
6. 5	Pruebas de inmunogenicidad	61
6. 6	Western blot	62

6. 7 Sensibilización de placas para ELISA	62
7. Discusión	67
8. Conclusiones	72
9. Recomendaciones	73
10. Bibliografía	73

Índice de figuras

- Figura 1.** Representación esquemática genoma del virus de la Fiebre Aftosa.
- Figura 2.** Representación de la estructura de la cápside de VFA. Ruta de ensamblaje.
- Figura 3.** Ciclo viral infeccioso virus fiebre aftosa.
- Figura 4.** Diagrama del proceso de producción de la vacuna anti-aftosa. (Biogénesis, 2005).
- Figura 5.** Mapa de estatus oficial de fiebre aftosa de los países Miembros de la OIE
- Figura 6.** Mapa del estatus oficial de fiebre aftosa en américa del sur
- Figura 7.** Tabla de perdidas estimadas del sector ganadero valoradas en dólares. Cifras en pesos valoradas con tasa de cambio de \$3.038 x dólar.
- Figura 8.** Perfil cromatográfico del cultivo de virus del serotipo VA24C del VFA.
- Figura 9.** Electroforesis SDS PAGE al 12.5%. separación cromatografica serotipo VA24C.
- Figura 10.** Espectro de MALDI-TOF de la proteína identificada con PNC 3D.
- Figura 11.** Peso molecular proteína 3D suministrado por software Image Lab™.
- Figura 12.** Perfil cromatográfico obtenido en la cromatografía de intercambio iónico a partir del cultivo de virus del serotipo VO1C del VFA.
- Figura 13.** Electroforesis SDS PAGE al 12.5% Serotipo O1/Campos.
- Figura 14.** Electroforesis SDS PAGE al 12.5%, Sobrenadante del concentrado con PEG, durante el proceso de producción vacunal.
- Figura 15.** Mapa electroforético bidimensional de la proteína 3D.
- Figura 16.** Predicción de epítopes B de la proteína 3D, información obtenida por medio del programa Bcepred.
- Figura 17.** Grafica de resultados de flexibilidad de la secuencia de la proteína PNC3D.
- Figura 18.** Modelado estructura PNC3D, *loop* donde se encuentra el aminoácido ASP, determinante antigénico.

Figura 19. SDS-PAGE de los anticuerpos purificados por cromatografía de Afinidad. Carril1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Anticuerpos Totales ; Carril 3: IgG cargada con anticuerpos específicos.

Figura 20. Inmunodifusión de la proteína 3D con IgG producidas en la cromatografía de afinidad sefarosa-3D.

Figura 21. Western blot de la proteína 3D identificada por las IgG purificadas por afinidad de sefarosa-3D.

Figura 22. A. Placa de Elisa con las diferentes concentraciones de Ag PNC 3D, donde se aprecia el gradiente de color según su concentración (100- 3,125). **B.** Diagrama de los valores promedio de las absorbancias obtenidas en cada una de las diluciones.

Figura 23. Gráficos de dispersión de las replicas de los ensayos para la construcción de una curva estándar.

Índice de tablas.

Tabla 1. Aminoácidos con mayor flexibilidad de la secuencia del antígeno 3D

Tabla 2. Media y desviación estándar de cada una de las diluciones de PNC 3D de cada replica.

Tabla 3. Resumen del modelo de regresión lineal

Tabla 4. Tabla de ANOVA modelo de regresión lineal.

Tabla 5. Coeficientes estandarizados y no estandarizados.

Abreviaturas y siglas

a: Aminoácido.

Ac: Anticuerpo.

Ala (A): Alanina

Arg (R): Arginina

Asp (D): Ácido aspártico

Asn (N): Asparagina

BHK (Baby-Hamster Kidney): Riñón de hámster bebé.

BEI: Etilenimina binaria

Buffer: Solución tampón.

BSA: Seroalbúmina bovina.

C (-) : Control negativo

C (+) : Control positivo.

Cys (C): Cisteína

CMBSO: Centro de biología molecular severo Ochoa

cre: Elemento replicativo que actúa en cis

DEAE: Dietilaminoetil

DMSO: Dimetil sulfóxido

DTT: Ditiotreitól

ELISA: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas

EITB: Prueba de inmunoelectrotransferencia

FA: Fiebre Aftosa

Gly (G): Glicina

Glu (E): Ácido glutámico

Gln (Q): Glutamina

His (H): Histidina

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

ICA: Instituto Colombiano Agropecuario

Ig: Inmunoglobulina

IDGA: Inmunodifusión en gel de agar

IRES: Sigla en inglés para "sitio interno de unión a los ribosomas"

Ile (I): Isoleucina

kDa: Kilo Daltons

Leu (L): Leucina

Lys (K): Lisina

MALDI: Desorción/ionización mediante láser asistida por Matriz, acoplada a un analizador

TOF: Tiempo de vuelo.

Met (M): Metionina

mg: Miligramo.

ml: Mililitro.

mM: Milimolar.

nt: Nucleótido

NaN₃: Azida de Sodio

Na₂HPO₄: Fosfato disódico

ng: Nanogramo.

OIE: Organización Mundial de la Salud Animal

ORF: Marco de lectura abierto

PAGE: (Polyacrylamide Gel Electrophoresis). Electroforesis en geles de Poliacrilamida

PANAFTOSA: Centro Panamericano de Fiebre Aftosa.

PBST: Buffer fosfato Tween

PEG: Polietilenglicol

pI: Punto Isoeléctrico

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.

Phe (F): Fenilalanina

poli(A): Tracto poliadenílico

poli(C): Tracto policitidílico

PNC: Proteínas No Capsidales

PKs: Pseudonudos (pseudoknots)

RNA: Ribonucleic Acid, Ácido ribonucleico

Pro (P): Prolina

r.p.m: Revoluciones por minuto.

SDS: Dodecil sulfato de sodio-Detergente aniónico.

Ser (S): Serina

TEMED: Tetrametiletilendiamina

Thr (T): Treonina

Trp (W): Triptofano

Tyr (Y): Tirosina

Val (V): Valina

VFA: Virus de la fiebre aftosa

VPg: Viral Protein Genome

WB: Western Blot

UTR: Untranslated region. Región no codificante

μl: Microlitro.

μg: Microgramo.

INFORMACIÓN GENERAL DEL PROYECTO

Título: Purificación y caracterización de las proteínas no capsidales del virus de la fiebre aftosa y obtención de anticuerpos policlonales: Su implicación en el control de calidad de la vacuna anti-aftosa.
Realizado por: Tatiana María Garcés Parada
Director del Proyecto: Luis Fernando Arbeláez Ramírez
Línea de investigación: Proteómica
Área: Biomoléculas
Grupo de investigación: Grupo de investigación en Química
Fuentes de financiación: Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad de Pamplona, Limor de Colombia
Institución: Universidad de Pamplona
Localización: Pamplona, 21 de junio de 2019

RESUMEN.

Las proteínas no capsidales (PNC) del virus de la fiebre aftosa se utilizan como marcadoras en la evaluación de animales que han estado en contacto con el virus, a diferencia de los inmunizados, que no deben presentar anticuerpos contra estas proteínas, debido a que en el proceso de elaboración vacunal deben ser eliminadas según la normativa internacional.

El objetivo del presente trabajo de grado fue, buscar el mejor método de purificación para una proteína no capsidal del virus de la fiebre aftosa y así mismo inducir la producción de sus anticuerpos policlonales *in vivo* y monitorear su inmunodetección, para la realización de una curva estándar que sirva de referencia en una prueba inmunoenzimática de ELISA.

El aislamiento y purificación se hizo del cultivo de virus inactivo, por cromatografía de intercambio iónico. La elución de los picos fue sometida a electroforesis para su posterior identificación por espectrofotometría de masas; las proteínas encontradas del proceso fueron las pertenecientes al hospedador (Rodentia), albumina bovina, la proteína capsidal VP3 y la proteína no capsidal 3D-3B en complejo y esta misma 3D en estado puro en el serotipo VA24C. Demostrando esta última tener un alto grado de pureza (> 95%) en el pico tres del cromatograma; su identificación se hizo por la técnica de electroespray de trampa iónica. La proteína purificada 3D, se inoculó en cabras y el suero hiperinmune fue precipitado y sometido a cromatografía de afinidad para la obtención de inmunoglobulinas (IgG); la reacción inmunitaria se confirmó por medio de inmunodifusión, Western blot y una prueba inmunoenzimática que confirmó el grado de afinidad que hubo entre el antígeno y el anticuerpo purificado. Con este último se realizó una curva estándar con cada una de las réplicas mostrando una tendencia lineal, con un $R= 0,942$ y una desviación estándar muy baja, lo que permitió validar un modelo inicial, para que en próximos experimentos se pueda establecer la especificidad y sensibilidad del método, y así logre medir el remanente que queda de las PNC en cada uno de las etapas de producción vacunal, lo cual garantizaría antes de evaluarla por los métodos indirectos tradicionales, tener un producto de alta calidad sin contaminantes.

ABSTRAC

Non-capsid proteins (PNC) of the foot-and-mouth disease virus are used as markers in the evaluation of animals that have been in contact with the virus, unlike those immunized, which should not present antibodies against these proteins, because in The vaccination process must be eliminated according to international regulations.

The objective of the present grade work was to look for the best purification method for a non-capsidal FMD virus protein and also induce the production of its polyclonal antibodies in vivo and monitor its immunodetection, for the realization of a standard curve to serve as a reference in an ELISA immunoenzymatic test.

Isolation and purification was done from the inactive virus culture, by ion exchange chromatography. The elution of the peaks was subjected to electrophoresis for subsequent identification by mass spectrophotometry; the proteins found in the process were those belonging to the host (Rodentia), bovine albumine, the capsid protein VP3 and the non-capsidal protein 3D-3B in complex and this same 3D in its pure state in the serotype VA24C. Demonstrating the latter have a high degree of purity ($> 95\%$) at peak three of the chromatogram; Its identification was made by the ion trap electro-spray technique. The purified 3D protein was inoculated in goats and the hyperimmune serum was precipitated and subjected to affinity chromatography to obtain immunoglobulins (IgG); the immune reaction was confirmed by immunodiffusion, Western blotting and an immunoenzymatic test that confirmed the degree of affinity between the antigen and the purified antibody. With the latter, a standard curve was made with each of the replicas showing a linear trend, with an $R = 0.942$ and a very low standard deviation, which allowed validating an initial model, so that in future experiments the specificity can be established and sensitivity of the method, and thus manage to measure the remaining remnants of the NCPs in each of the stages of vaccine production, which would ensure before evaluating it by traditional indirect methods, to have a high quality product without contaminants.

Purificación y caracterización de las proteínas no capsidales del virus de la fiebre aftosa y obtención de anticuerpos policlonales: Su implicación en el control de calidad de la vacuna anti-aftosa.

1. Introducción

Las proteínas no capsidales (PNC) del virus de la fiebre aftosa (FA) son moléculas que interfieren en la producción de la vacuna anti-aftosa, ya que estas poseen la maquinaria para la replicación del RNA genómico y en la formación de partículas virales en las células del huésped¹. Motivo por el cual durante el proceso de producción de la vacuna contra la FA las PNC son eliminadas por medio de diferentes técnicas entre ellas la filtración y precipitación².

El control de la FA es una responsabilidad regional, nacional e internacional, para lo cual se emplea la vacunación; la cual ha demostrado ser una herramienta eficaz en el control de la enfermedad³. Alrededor del mundo el sistema de vacunación profiláctica es ampliamente utilizado en países o zonas con ecosistemas endémicos y de brotes esporádicos de la enfermedad, y en aquellos países o zonas libres con vacunación, cuya vecindad con territorios o ecosistemas en donde el virus circula, lo que obliga a vacunar como medida de gestión de riesgo ante una eventual exposición. América del Sur presenta un largo historial de campañas basadas en vacunación. En la región Andina los programas de vacunación profiláctica se estructuran de acuerdo a la situación epidemiológica y el perfil de riesgo sanitario identificado en cada una de las zonas y países que la conforman. Actualmente Colombia tiene suspendido el reconocimiento de la OIE como libre de FA con vacunación, después de tantos años de otorgarlo, los brotes presentados conllevaron a esta decisión por parte de este ente ⁴.

En la actualidad el principio de detección de la enfermedad reconoce anticuerpos contra las PNC con el método de ELISA en diferentes formatos ^{5, 6, 7, 8}. Se han desarrollado desde la década de los noventa diferentes métodos de ELISA con alta sensibilidad y especificidad para la detección de anticuerpos contra diferentes PNC como marcadores específicos de infección. Luego de varios estudios realizados, se observó que las PNC 3AB y 3ABCD, son las que poseen mejores propiedades como marcadoras de infección y diferenciación de animales infectados de vacunados ^{5, 7, 9, 10}.

Hoy en día la técnica de tamiz propuesta como referencia por la OIE para la detección de anticuerpos contra PNC, es el I-ELISA 3ABC. Este ELISA utiliza antígenos recombinantes que se adsorben directamente en la microplaca ^{11, 12}.

Su uso está ampliamente difundido por toda Sudamérica donde es utilizada oficialmente como herramienta para la vigilancia epidemiológica tanto en planes de erradicación, como para garantizar la no circulación viral en regiones libres de FA con poblaciones bovinas vacunadas sistemáticamente, además para garantizar la pureza de la vacuna frente a las PNC ^{13,14}.

La ausencia de anticuerpos contra las PNC en el suero de animales vacunados garantizan la pureza de las vacunas; Si bien en las últimas décadas se han hecho grandes avances en cuanto al control de calidad y seguridad de las vacunas, la pureza debe ser confirmada de una manera contundente con un método directo *in vitro*, que cuantifique las impurezas que quedan en el producto final antes de que sea sometido a pruebas indirectas.

2. Planteamiento del problema y justificación.

La presencia del virus de la fiebre aftosa (VFA) a lo largo del tiempo ha generado grandes pérdidas económicas, comerciales y sociales, en todos los países afectados. Esta enfermedad es la más devastadora en la ganadería¹⁵. Las pérdidas económicas se deben a la reducción en la productividad del animal, pérdidas de peso en los animales infectados, abortos, reducción en la producción de leche, caída en el precio interno de la carne, cierres en las exportaciones etc. En este último brote de la enfermedad en Colombia se han cerrado mercados de exportación hacia Rusia, México, Curazao y Chile. Todo esto generando unas pérdidas económicas entre el 2017 y 2018, alrededor USD 196.14, unos 600.000 mil millones de pesos¹⁶.

Para la erradicación del virus, se utiliza el rifle sanitario y revacunación como medida profiláctica con la finalidad de que virus no se expanda rápidamente por todo el país.

El manejo de esta patología se encuentra a cargo a nivel internacional por la organización mundial en sanidad animal (OIE) y el centro Panamericano de Fiebre Aftosa (PANAFTOSA) junto con los entes de control de cada país ^{3,17}. En Colombia el Instituto Colombiano Agropecuario ICA, supervisa que se cumpla las normativas establecidas, vigilando el control de calidad en cada uno de los lotes de vacunas, requisito indispensable para autorizar su distribución y aplicación¹³.

Motivo por el cual es importante hacer un control de calidad estricto a estos productos, dentro de este proceso existe la realización de las pruebas físico - químicas (volumen, estabilidad, conductividad e inyectabilidad) y pruebas biológicas como esterilidad, inocuidad en células BHK, potencia indirecta en bovinos por ELISA CFL y Pureza a PNC) ^{12, 17}.

Enfocados en la Prueba de Pureza a PNC, esta se realiza en una región libre de FA con vacunación y consiste en aplicar la dosis recomendada por el laboratorio productor a un grupo de 30 bovinos machos entre 18 y 24 meses de edad, que hayan sido con anterioridad negativos a anticuerpos contra las PNC (serotipos A24 Cruzeiro y O1 Campos) y dos bovinos controles sin vacunar. A los 30 días post-vacunación, son revacunados con la misma dosis. Para que la prueba de pureza a las PNC se considere satisfactoria, todos los bovinos revacunados deben ser NO reactores en el sistema I ELISA 3ABC/EITB ^{12, 17}.

Con esta prueba de pureza, se pretende poder discriminar animales infectados de los vacunados, ya que estos últimos no deben presentar anticuerpos contra las PNC, debido a que en el proceso de producción estas proteínas deben ser eliminadas según la normativa¹². El remanente debe ser tan poco que no logre inducir una respuesta inmune ^{12, 14}.

La problemática nace debido a que actualmente se utiliza solo este método indirecto para aprobar o rechazar un lote vacunal, que tarda 90 días su concepto técnico. Además una prueba indirecta debería ir acompañada de una prueba directa *in vitro* que mida el remanente de las PNC durante el proceso de producción, a fin también de que los laboratorios productores puedan tener pruebas en sus protocolos de la eliminación de estas proteínas durante el proceso de producción.

Esta situación justifica la importancia de investigar la manera de elaborar una prueba directa inmunoenzimática, que se pueda usar durante las distintas etapas del proceso de producción, a fin de obtener un producto de calidad, que sirva como soporte de pureza frente a estas proteínas y no genere en los animales inmunogénicidad frente a ellas, logrando el objetivo que es la diferenciación entre animales vacunados de infectados. Por este motivo desde el campo de la Proteómica se plantea purificar una de las proteínas no capsidales de manera

nativa a partir del cultivo de virus y sobrenadante del concentrado, en especial la proteína 3D, que es RNA polimerasa involucrada directamente en la replicación del virus y es marcador de la presencia de la infección, esta purificación nos permitirá utilizarla para inducir la producción de anticuerpos policlonales contra esta misma, y a su vez estos IgG sean útiles en una prueba de Elisa directa que mida el remanente en el proceso vacunal.

Con esta contribución se pretende dar los primeros pasos, determinando una curva patrón que sirva de modelo para hacer los primeros experimentos con los antígenos que se encuentran en las suspensiones virales, brindando una estimación cuantitativa de la masa de antígeno remanente presente en la muestra analizada. Esto conllevaría a beneficiar a los laboratorios productores de la vacuna, a la comunidad ganadera y todo el país en general.

3. Marco teórico

3.1 Virus de la fiebre aftosa

3. 1. 1 Genoma del virus de la fiebre aftosa

El VFA es el agente viral causante de la fiebre aftosa, pertenece al género *Aftovirus* de la familia *Picornaviridae*¹. Esta familia está compuesta por siete serotipos A, O, C, Asia-1, y Territorios de Sur África 1 (South African Territories-1 - SAT1), SAT2, y SAT3, además de una amplia variedad de subtipos y topotipos dentro de cada serotipo ^{18, 19}.

Es un virus pequeño de 25-30 nm de diámetro, desnudo e icosaédrico, el cual al interior de su cápside protéica almacena un genoma ARN de hebra sencilla y de sentido positivo, su peso molecular es de $2,7 \times 10^3$ Daltons, que corresponde a un tamaño de aproximadamente 8500 nucleótidos²⁰. El ARN contiene un único marco de lectura abierto comprendido entre los nucleótidos 1039 y 8023, que codifica para una larga poliproteína con 2336 aminoácidos (a.a) y peso molecular de 259 KDa; Esta poliproteína atraviesa por un proceso proteolítico durante la traducción a causa de proteasas codificadas por el virus ²¹. (Ver figura 1).

3. 1. 2 Regiones no codificantes (UTRs).

En el extremo 5' se localiza la porción S (por su sigla en inglés small) porción pequeña del genoma la cual posee un tamaño de 1300 bases se ha determinado que participa en la replicación viral y en la producción de exonucleasas ²².

Fragmento de poli(C): Región de longitud variable, asociado a la proteína PCBP (del inglés poly(C) cellular binding protein, proteína celular ligada al poli(C) y serviría en la circularización del genoma junto con esta proteína para iniciar el cambio de traducción a replicación durante el ciclo de crecimiento viral ²³.

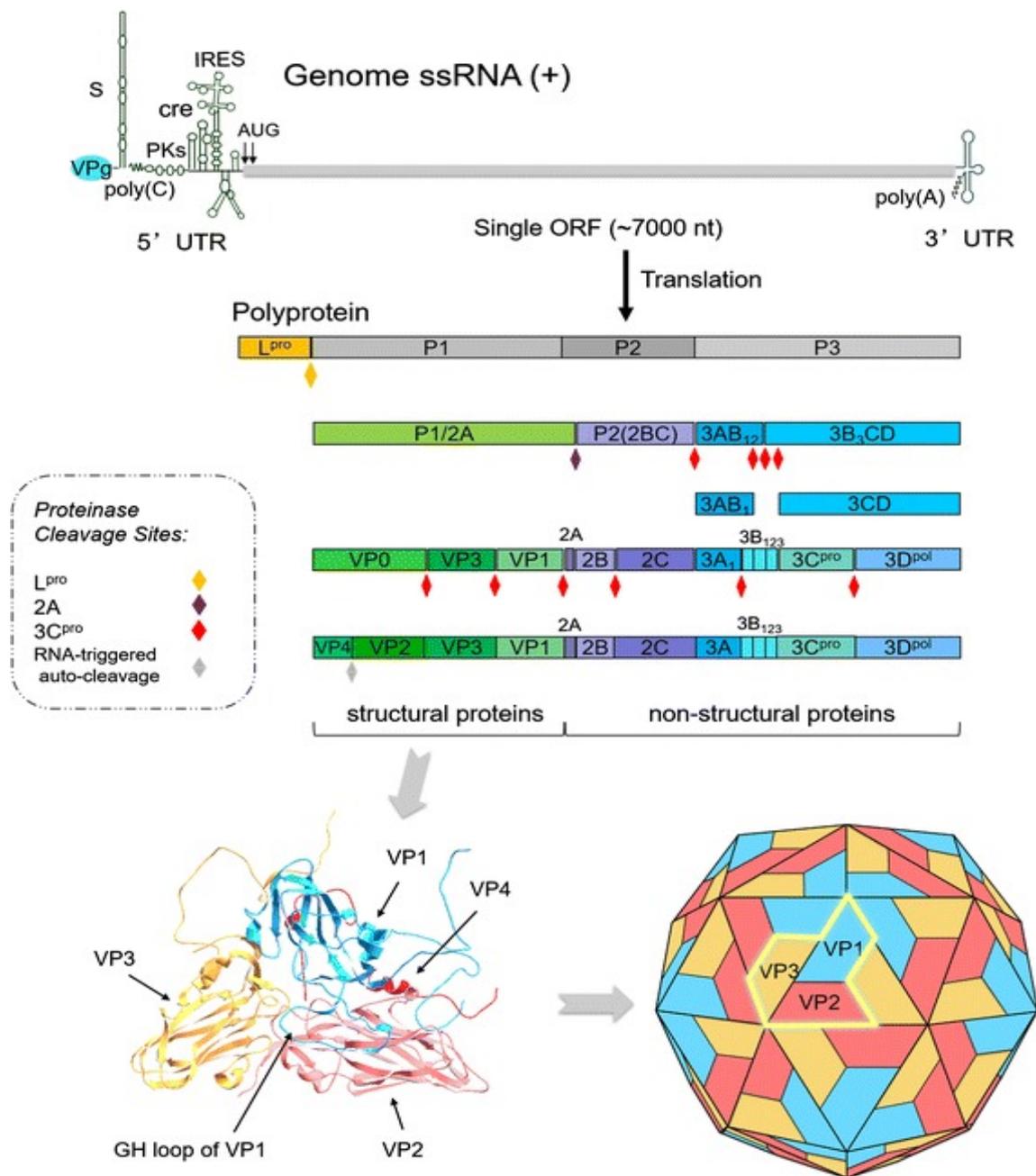


Figura 1. Representación esquemática del genoma del virus de la Fiebre Aftosa. La estructura genómica del VFA, el cual posee alrededor de 8000 a 8500 bases de longitud unido covalentemente en la región extremo terminal 5', con un residuo de 23 a 24 aminoácidos a la proteína 3B conocida también como VPg en inglés (*virus protein genoma*). El sitio interno de entrada al ribosoma o IRES; S que es la porción pequeña de la poliproteína; PKs que corresponden a las proteínas Pseudonockouts, la ORF se muestra en el área encaja con las proteínas virales estructurales y no estructurales. (Gao, 2016).

Las proteínas PKs o Pseudonockouts se le atribuye la función de replicación del RNA y es el elemento actuante en *cis*. El extremo poliC de la poliproteína el cual posee 100 bases contiene el 90% de residuos de cisteína (U y A), formando junto con la porción S y el extremo poliC con 700 bases lo que se conoce como una estructura secundaria altamente conservada ²⁴.

Sitio *Cre* (“cis-acting replication element”): Se trata de una estructura altamente estable tipo “stem-loop” de 55 nucleótidos de longitud aproximadamente. Este elemento es necesario para la replicación del ARN de los Picornavirus²⁵, donde el loop del *cre*, a través de un motivo altamente conservado (AAACA), actúa de molde para la uridilación de la proteína VPg (3B)²⁶. A su vez, el producto VPg uridilado (VPgpU o VPgpUpU) sirve de molde para la síntesis de la hebra negativa de ARN, esencial para la replicación²⁴. Se ha observado complementación de la función de *cre* en trans ²⁷. El VFA es el único miembro de la familia Picornaviridae, en el que el *cre* se ubica en la región no codificante ²⁷.

IRES (sitio de entrada interna del ribosoma): región altamente estructurada que media la síntesis de proteínas virales de manera cap-independiente ²⁸. El VFA presenta una longitud de 462 nt y está estructurado en 5 dominios (1-5 o G-L) ^{29, 30}. con un alto grado de conservación filogenética, lo cual apoya su relevancia. Se han identificado algunos motivos que son esenciales para mantener su actividad y organización estructural, así como para la interacción de algunas proteínas celulares (PTB, PCBP-2, ITAF45, eIF4G, eIF3 y eIF4B), posee un codón de traslación inicial AUG ³¹.

3. 1. 3 Región codificante.

Constituye la mayor parte del genoma viral, con aproximadamente 7000 nt de longitud, y da origen a una única poliproteína de alrededor de 2330 a.a, cuya traducción puede comenzar en

dos codones AUG funcionales, separados entre sí por 84 nt ³². A medida que la traducción progresa, la poliproteína es procesada por proteasas virales, dando origen a 4 precursores L, P1, P2 y P3, que finalmente y tras el procesamiento completo da lugar a 12 proteínas virales maduras ³³.

La proteína líder o proteína L posee los codones de iniciación AUG se relaciona con el factor de virulencia y la transmisión viral entre huéspedes; esta proteína autocliva para dos variantes la: Lab y la Lb, esta última se autocliva en su extremo carboxilo terminal atribuyéndole funciones en la degradación del factor celular de iniciación de la traducción (eIF4G), llevando a un bloque *cap* dependiente de las proteínas así la síntesis proteica dentro de la célula se deriva solo a proteínas virales siendo independiente del eIF4G. Estos clivajes son llevados a cabo mayoritariamente por proteasas codificadas por el virus (L^{pro}, 2C^{pro}, 3C^{pro}). El genoma del VFA se divide en cuatro regiones codificantes denominadas L, P1, P2 y P3.

L con un peso molecular de 23. 000 Da, P1 de 81. 000 Da, P2 de 54. 000 Da y P3 de 100.000 Da. En total se forman 12 proteínas maduras finales: (L, 1A, 1B, 1C, 1D, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C y 3D) ^{34, 35}. La región L, ubicada en el extremo 5', codifica para un polipéptido líder que se autocliva del extremo amino terminal del precursor de las proteínas de la cápside entre una lisina y una glicina. Hacia el extremo 3' de la región L se halla la región P1, que codifica para las cuatro proteínas estructurales en el orden VP4, VP2, VP3 y VP1³⁶. Esta región es inicialmente hidrolizada en tres regiones (1AB, 1C y 1D) que codifican las proteínas VP0, VP3 y VP1, respectivamente (5'-3'). Finalmente, los polipéptidos VP4 y VP2 son liberados de la VP0 por hidrólisis durante el proceso de encapsidación del ARN ^{36, 37}.

Una copia de VP1, VP3 y VP0 (VP2 más VP4) se ensamblan formando un protómero biológico. Cinco protómeros se asocian formando un pentámero, y doce pentámeros se unen para formar una cápside de simetría icosaédrica (Figura 2). La entrada del RNA viral es una señal que induce el autoprosesamiento de VP0 en VP4 y VP2 ³⁸.

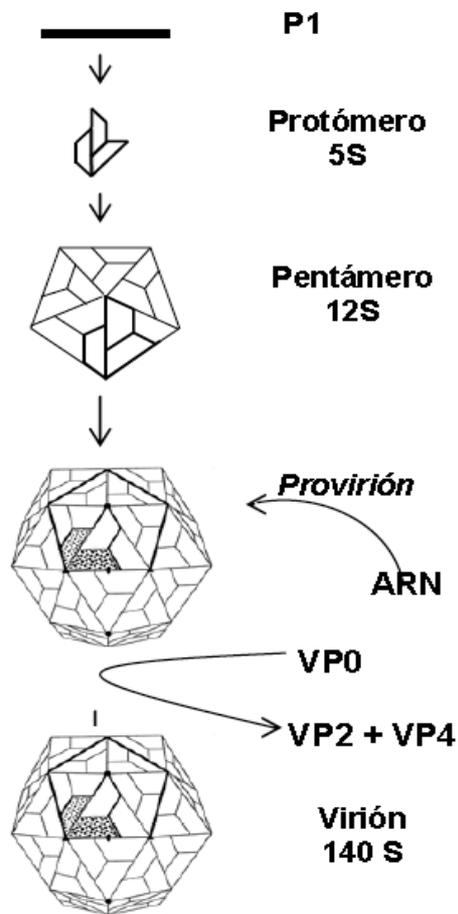


Figura 2. Representación de la estructura de la cápside de VFA. Ruta de ensamblaje. Este proceso i) desencadena un proceso autoproteolítico en el que la mayor parte de las moléculas de VP0 son fragmentadas para generar VP4 y VP2, lo cual es imprescindible para la infección; ii) provoca un ordenamiento de los extremos Nt de VP1 y Ct de VP4 situados cerca de los ejes ternarios que refuerza las interacciones entre las subunidades de la cápside (Curry et al ., 1997); y iii) aumenta ligeramente la sensibilidad a pH del virón (Curry et al. , 1995).

Con respecto a las regiones P2 y P3, que codifican a las proteínas no capsidales (PNC) del virus, se conoce que intervienen dentro del proceso de replicación ³⁹.

En la región P2 se encuentra tres proteínas, dentro de ellas, la 2A que es un péptido de 16 a.a que cataliza en *cis* la escisión de P1-2A de 2BC, mediante un proceso de parada y reiniciación del ribosoma ⁴⁰. La proteína 2B es determinante dentro del rango del hospedador y esta asociada a la formación de vesículas membranosas en la replicación viral y la proteína 2C, se encuentra involucrada en la síntesis de ARN con posible actividad helicasa y se encuentra altamente conservada, estas se localizan en las vesículas derivadas de retículo endoplasmático ⁴¹.

La región P3, codifica para 4 proteínas no estructurales 3A, 3B, 3C y 3D. La proteína 3A, la cual es una proteína de membrana integral multifuncional que mejora la síntesis de ARN viral y muestra marcadores relacionados con el hospedador ⁴² en el anclaje a membrana del complejo de replicación ⁴³, en el efecto citopático y en la inhibición de la secreción de proteínas ⁴⁴. La proteína 3B, que tiene tres copias no idénticas en el genoma, la proteasa 3C, responsable de la mayoría de los clivajes del procesamiento primario y secundario de la poliproteína precursora, Finalmente, 3D codifica el ARN viral dependiente la ARN polimerasa ²².

3. 1. 4 Región 3' no codificante.

Esta región se encuentra tras el codón de terminación de la poliproteína y presenta una longitud de aproximadamente 90 nt, estructurada en dos bucles ^{22,23}, seguido de una cola de poli(A) de longitud variable ^{45,46}. El poli(A) interviene en el inicio de la síntesis de ARN de polaridad negativa, a través de los residuos de adenilato terminales que actúan como molde con el que se aparea el iniciador 3B-pUpU; su eliminación afecta la infectividad del ARN de VFA ⁴⁵. Así mismo interviene, a través de una serie de proteínas que se unen a el, en la circularización del genoma previamente al inicio de la replicación ^{46,47,48}

3. 1. 5 Proteínas no capsidales

3. 1. 5. 1 Proteínas no capsidal 3B

La región 3B codifica 3 copias diferentes (3B1, 3B2, 3B3). Esta proteína también conocida como VPg, sirve como cebador para el inicio de la replicación del ARN y desempeña un papel como señal de encapsidación. El enlace covalente de VPg se produce a través de un residuo de tirosina (Y) en el extremo 5' del genoma viral de ARN de sentido positivo y en los ARN virales de cadena positiva más y menos. Esta etapa de preparación requiere la uridilación del péptido VPg por la polimerasa viral 3D y otros cofactores virales o del huésped. Estudios sugieren que puede ser un componente crítico del complejo de replicación viral, que mejora la eficiencia de la transcripción del genoma viral. Los clones infecciosos del virus de la fiebre aftosa diseñados con alteración severa del dominio o eliminación de proteínas 3B individuales no muestran una capacidad infecciosa disminuida *in vitro*, ni alteran la enfermedad clínica en el ganado bovino o porcino. Solo los clones que codifican una copia única de VPg parecen tener problemas de competencia replicativa ^{25, 26}.

3. 1. 5. 2 Proteína no capsidal 3D

3D pol es una RNA polimerasa dependiente de RNA (RpRd), Conocida como antígeno VVIAA (del inglés viral infection associated antigen, antígeno asociado a la infección viral), posee una secuencia de nt y a.a altamente conservada en todos los serotipos y subtipos del VFA. Juega un rol importante, no solo en el ciclo de vida del virus ARN, sino también en su potencial adaptativo ^{49, 50}

Los picornavirus usan un precursor 3CD como un intermediario funcional en la replicación viral, aunque contiene un componente 3C activo, 3Dpol permanece inactiva hasta que el procesamiento proteico es completo ⁵¹. La replicación en picornavirus es iniciada por una

proteína iniciadora, un primer. La proteína primer VPg provee el hidroxilo nucleófilo y forma un complejo con 3Dpol o 3CD (complejo de uridilización) ^{25, 52}. En el VFA, la Vpg se une al sitio activo de la 3Dpol donde se cataliza la reacción de uridilización para dar comienzo a la síntesis del ARN ^{50, 53}. La estructura tridimensional de la 3D ha sido experimentalmente determinada ^{54, 55}; El sitio activo se observó mediante estructuras cristalinas de los complejos 3D-VPg y diferentes estados de la incorporación de nt durante la elongación ^{53, 56}.

3. 1. 6 Ciclo de replicación viral

Al igual que otros virus pertenecientes a la familia de los Picornaviridae, su ciclo infeccioso es corto aproximadamente de 4 a 6 horas postcontacto, el virus es de carácter citolítico lo cual indica que las células infectadas exhiben alteraciones morfológicas comúnmente llamado efecto citopático (ECP), que induce alteración y redistribución de la membrana celular interna⁵⁴. El Aftovirus también ocasiona ciertas alteraciones bioquímicas como por ejemplo inhibición y alteración de los mecanismos de traslación y transcripción en la célula huésped.

La infección en cultivos celulares comienza con la adsorción del virus a la membrana plasmática de la célula hospedadora (Figura 3). Su etapa inicial está gobernada por fuerzas electrostáticas, resultando necesaria la presencia de cationes bivalentes como Ca^{2+} y Mg^{2+} ⁵⁷. El VFA ha sido el primer virus para el cual se ha sugerido que su sitio de unión reconoce receptores de la familia de las integrinas ⁵⁷, y existen evidencias de que 10s residuos RGD (Arginina- Glicina- Ac. Aspártico) tienen una importancia particular en el reconocimiento de dicha familia de receptores ⁵⁷

Las moléculas integrinas de la célula usan esta secuencia RGD para iniciar el proceso de endocitosis mediada por receptores. Donde ocurre la liberación del genoma viral dentro del citoplasma de la célula y se da el comienzo de la traducción del RNA por mecanismo *cap*

independiente dado por el reconocimiento del sitio IRES generando una poliproteína la cual es auto clivada por mecanismos auto catalíticos resultando la generación de proteínas funcionales 58.

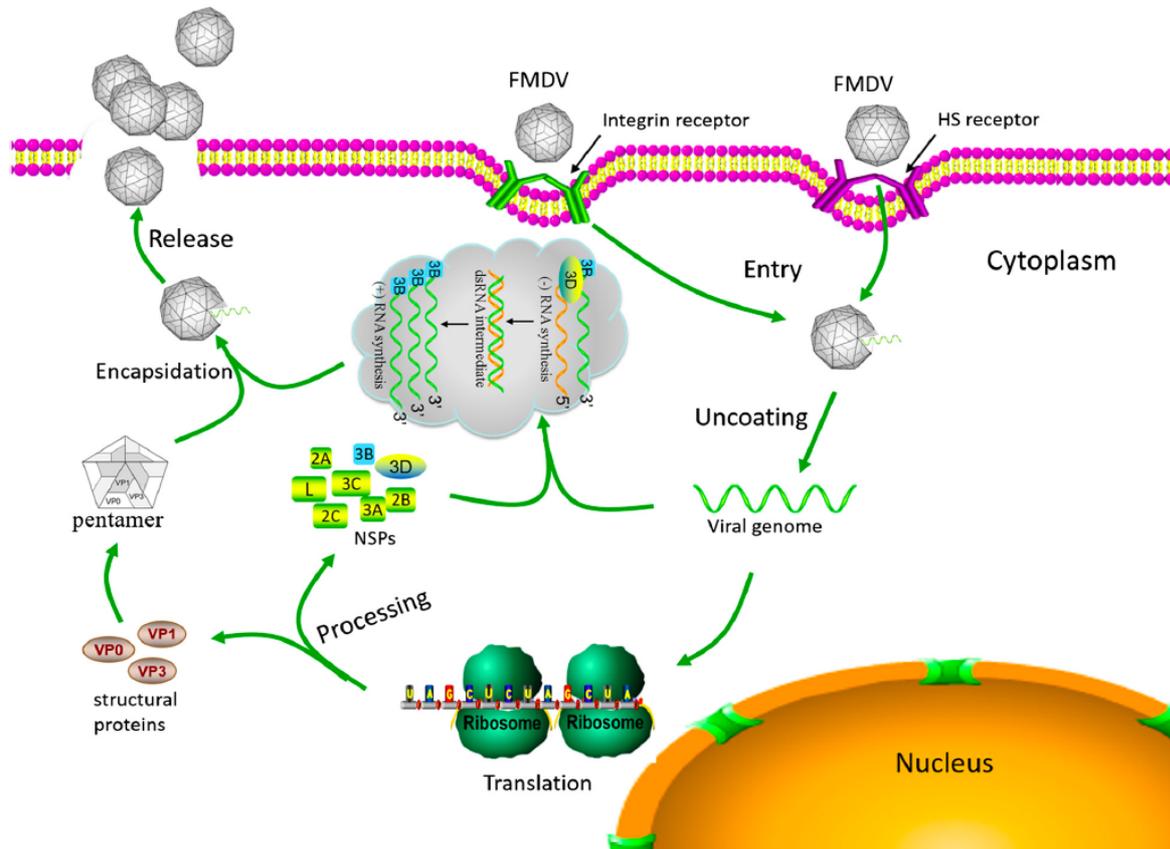


Figura 3. Ciclo viral infeccioso virus fiebre aftosa. (Gao, 2016).

El extremo 5' del RNA viral está unido covalentemente a la proteína viral VPg y el extremo 3' codifica el segmento poliA, de esta manera la RNA polimerasa dependiente realiza un proceso de diferenciación entre el RNA viral y el RNAm celular para la replicación. La RNA polimerasa dependiente sintetiza cadenas complementarias negativas que dan origen a la síntesis de cadenas con polaridad positiva para el empaquetamiento y formación de nuevos viriones (virión maduro 146s), generando el autoclivaje de VP0 y VP4 como proceso final

para la maduración. En este paso ocurre el reordenamiento de la cápside y finalmente ocurre la lisis celular y liberación de partículas virales infectivas ⁵⁹.

3. 2 La fiebre aftosa

3. 2. 1 Transmisión y Sintomatología.

La fiebre aftosa (FA) es una enfermedad viral altamente contagiosa e inmunológicamente compleja, con un amplio rango de hospedadores y un estado portador muy perjudicial para su control. Afecta a una amplia gama de animales herbívoros biungulados; tanto domésticos, bovinos, porcinos y caprinos como salvajes, ya que existen más de setenta especies dentro de las veinte familias de mamíferos que han resultado susceptibles a la infección natural o experimental ⁶⁰.

Esta enfermedad fue descrita por primera vez en Italia en el año 1546 por Frascatorius y el agente causal de la misma, llamado VFA, fue identificado por Loeffler y Frosch en 1897, siendo además el primer virus animal reconocido ⁶¹.

La principal ruta de infección es el tracto respiratorio. La replicación viral ocurre rápidamente en las células epiteliales de la zona orofaríngea y da lugar a la formación de una vesícula o afta primaria. La viremia se origina al cabo de tres o cuatro días; el virus pasa al torrente sanguíneo y se distribuye por todo el organismo alcanzando epitelios alejados del punto de entrada, provocando la aparición de aftas secundarias. Una de las regiones del cuerpo del animal en que más frecuentemente aparecen aftas secundarias son las extremidades, lo que provoca debilidad y tendencia a la postración ⁶².

En los bovinos, los primeros síntomas de la enfermedad aparecen tras un período de incubación de dos a ocho días. Estos son fiebre, anorexia y disminución de la producción láctea; desarrollo de vesículas o aftas en la mucosa bucal, espacios interdigitales y epitelio de los pezones ^{62, 63, 64}. Las vesículas aumentan de tamaño y se rompen, generando áreas de daño

epitelial, que de acuerdo a su ubicación, producen salivación abundante o complicaciones para caminar; en consecuencia, se dificulta la alimentación, el ordeño y la lactancia ⁶⁴. Todo esto redundaría en una rápida pérdida de peso del animal y en una acentuada baja en la producción de leche. La enfermedad en los ovinos y caprinos es en general, clínicamente más leve que en los bovinos, con predominancia de lesiones en las patas; pudiendo incluso pasar inadvertida ⁶⁴.

Durante la fase aguda de la enfermedad se encuentran altos niveles de virus en todas las secreciones, en los aerosoles respiratorios, en sangre, órganos y tejidos ⁶⁵.

El virus se transmite de animales infectados a animales susceptibles por contacto directo a través de la saliva, leche y semen, ó por inhalación, ingestión o penetración de partículas infecciosas en lesiones de la piel ^{62 64}. La transmisión indirecta puede ocurrir a través de productos animales contaminados, restos de animales, equipos agrícolas, personas, ropa, etc.

La afección resulta benigna en la mayoría de los casos. La recuperación lleva, por lo general, entre dos o tres semanas⁶⁶. Sin embargo, en los animales más jóvenes, esta infección viral puede producir miocarditis, y la tasa de mortalidad puede elevarse entonces hasta un 50%. La mortalidad por la FA es inferior al 6% en animales adultos, y los tejidos dañados se regeneran rápidamente⁶⁷. La respuesta inmune humoral que se desarrolla contra el virus permite la disminución de la viremia y la recuperación de la enfermedad ⁶⁸.

Si bien los adultos se sobreponen sin mayores inconvenientes, existe un número variable de animales que se convierten en portadores asintomáticos de la enfermedad, transformándose en verdaderos reservorios del virus. El estado portador puede durar unas semanas o prolongarse durante años. En este tiempo, es posible encontrar virus infectivo o ARN viral en hisopados faríngeos ^{69, 70}. La importancia del estado portador radica no solo en la permanencia del virus en el campo, sino que se ha sugerido también que podrían aparecer variantes debido a cambios durante su replicación persistente ⁷¹.

3. 2. 2 Diagnóstico de la fiebre aftosa.

3. 2. 2 . 1 Detección viral

Si se cuenta con una muestra sospechosa de enfermedad vesicular se intenta la detección viral. Actualmente la técnica empleada en la confirmación del diagnóstico clínico y en la identificación del serotipo viral es por RT-PCR⁷². Para amplificar los fragmentos del genoma del virus de la FA. Esta técnica se emplea para la detección y tipificación del VFA.

Tiene una sensibilidad comparable a la del aislamiento del virus y los procedimientos automatizados mejoran el rendimiento de la muestra ^{72, 73}. Si bien, el RT - PCR para VFA cuenta con buenos porcentajes de sensibilidad y especificidad, la visualización del producto amplificado en gel de agarosa le quita objetividad a los resultados ya que depende, en muchos casos del operador. Recientemente, uno de los laboratorios mundiales de referencia para FA, Laboratory Pirbright WRL, ha desarrollado un método de detección cuantitativa de RT - PCR en tiempo real, el cual requiere instalaciones, equipamiento y personal especializado ⁷³.

Para investigar la presencia del ARN del virus de la FA en muestras de tejidos se han desarrollado técnicas de hibridación *in situ* ⁷⁴. Estas técnicas solo se utilizan en laboratorios especializados, aunque se están elaborando sistemas simplificados procedimientos para uso potencial en trabajo de campo

3. 2.2. 2 Detección de anticuerpos contra proteínas estructurales del VFA

La detección y cuantificación de Acs específicos para el VFA se puede realizar por ELISA fase líquida y seroneutralización. El ELISA fase líquida presenta una alta sensibilidad y especificidad ^{75, 76, 77} y puede detectar Acs contra proteínas estructurales del VFA en animales (bovinos, ovinos y porcinos) infectados experimentalmente a partir de los 5-8 días post infección. La seroneutralización es el método recomendado por la OIE como técnica “Gold

Standard” para la detección de Acs neutralizantes del VFA y es utilizada para la confirmación de los datos obtenidos por ELISA fase líquida ⁷⁷.

3. 2. 2. 1 Detección de anticuerpos contra PNC del VFA

La detección de Acs por ELISA de fase líquida o por seroneutralización no permite diferenciar si estos provienen de poblaciones de animales vacunados o infectados. En este aspecto la fiebre aftosa ha sido pionera en utilizar técnicas serológicas utilizando antígenos marcadores como las PNC ⁷⁸.

La importancia de estas técnicas se ha ido incrementando como herramienta epidemiológica para la vigilancia de la infección en zonas donde la vacunación es una de las principales medidas de lucha contra la enfermedad; ya sea durante la erradicación de la misma, la contención de un foco, o incluso en el mantenimiento de poblaciones libres de la enfermedad con planes de vacunación sistemáticos a toda la población bovina (como ocurre en Colombia). La primera técnica descrita para la detección de Acs contra las PNC como indicio de infección fue la prueba de inmunodifusión en gel de agar (IDGA). Debido a la baja sensibilidad de este test, Alonso y colaboradores en 1990, desarrollaron un ensayo inmunoenzimático de ELISA en fase líquida (ELISA - VIAA) para identificar y cuantificar los Acs contra el VIAA (Antígeno viral asociado a la infección) del VFA⁷⁸. Sin embargo, la mayor sensibilidad alcanzada mediante la aplicación de este tipo de ensayo, en comparación con el IDGA, generó un aumento en el número de resultados positivos en bovinos vacunados y reinmunizados con vacunas que contenían altas concentraciones de antígenos no purificados del VFA ⁷⁹.

Para superar las limitaciones mencionadas, se reemplazó el VIAA por un antígeno recombinante del VFA₈₀, la polimerasa 3D, con el propósito de eliminar la presencia potencial

de cualquier antígeno no específico en las preparaciones del VIAA, como pueden ser proteínas derivadas de células BHK o componentes de la cápside del VFA, y que pueden ser reconocidos en la prueba de IDGA - VIAA o ELISA por el suero de animales inoculados con vacunas producidas en BHK, llevando a resultados falso-positivos.

En un estudio realizado por Bergman y cols se analizaron muestras de bovinos sistemáticamente vacunados provenientes de regiones libres de FA y se observó que al realizar tanto la prueba IDGA - VIAA como IDGA - 3D algunos de los resultados falsos positivos por IDGA - VIAA en sueros de animales post - vacunados fueron eliminados por IDGA - 3D ⁸¹. En la actualidad el principio de detección de Acs contra PNC - VFA se ha transferido a la metodología de ELISA en diferentes formatos, detectando Acs contra otros tipos de PNCs las cuales no están presentes en las formulaciones vacunales oficialmente aprobadas ^{82, 83, 84, 85}

El sistema utilizado actualmente para demostrar la ausencia de dichos anticuerpos está conformado por una prueba de ELISA indirecto (I-ELISA) como “screening” que utiliza la poliproteína no capsidal del VFA 3ABC, seguido de la confirmación de las muestras sospechosas o reactivas mediante un ensayo inmunoenzimático de electrotransferencia (EITB), empleando como sondas serológicas las proteínas no capsidales del VFA 3A, 3B, 2C, 3D y 3ABC, obtenidas por métodos de recombinación genética, este método es utilizado como una prueba confirmatoria⁸⁶

3.3 Control de la patogenicia (Vacunación).

El Programa Nacional de Fiebre Aftosa tiene establecido que la vacunación se realice en forma obligatoria, cíclica y masiva en todos los animales de las especies bovina y bufalina, independientemente de su edad. De acuerdo a la Ley 395/95, la vacunación se realiza en dos

ciclos anuales, autorizados por resolución de la gerencia general del ICA ¹³, que se llevan a cabo en los meses de mayo - junio y noviembre - diciembre respectivamente, cada uno con duración de 45 días.

3. 3. 1 Producción de la vacuna

La vacuna actual contra la FA es de tipo inactivado, purificada y se formula con adyuvante oleoso para favorecer la respuesta inmune ^{4,12,14}. Esta vacuna induce a la formación solo de anticuerpos para las proteínas capsidales del virus. La producción de antígenos y vacunas contra la FA deben llevarse a cabo en condiciones que cumplan plenamente con las normas reconocidas internacionalmente de buenas prácticas de manufactura y de bioseguridad, con un nivel de biocontención provisto con aire filtrado HEPA en condiciones de presión positiva al ambiente en un nivel de seguridad biológica NSB3 según los estándares de la OIE y la OMS ^{4,12,14, 17}

En resumen el proceso consiste en una serie de birreactores de acero inoxidable sellados y unidos entre sí por tuberías de acero y elementos auxiliares, tales como filtros y equipos de concentración. La suspensión de células hospederas BHK (Baby Hámster Kidney), son fermentadas en un medio nutritivo, hasta alcanzar un recuento celular alto en una escala de varios miles de litros para luego decantar las células re suspendiéndolas en medio fresco. Las células son infectadas en forma independiente de acuerdo al serotipo de virus de FA (cepas de referencia en Sudamérica O1 Campos y A24 Cruzeiro); El tiempo va de 8 a 24 horas hasta producir un efecto citopático total ^{87. 88}

La solución viral se clarifica por filtración. La integridad del virus se mide por el peso molecular del virus. La solución viral es inactivada por adición de Etilenimina binaria (BEI

por sus siglas en ingles) en bio-reactores diferentes ^{87, 88}. A la solución inactivada se le adiciona polietilenglicol 6.000 (PEG) hasta una concentración final de 8%, el PEG arrastra las capsides al fondo del reactor, las PNC quedan en el sobrenadante y son decantadas ^{4, 12, 88}.

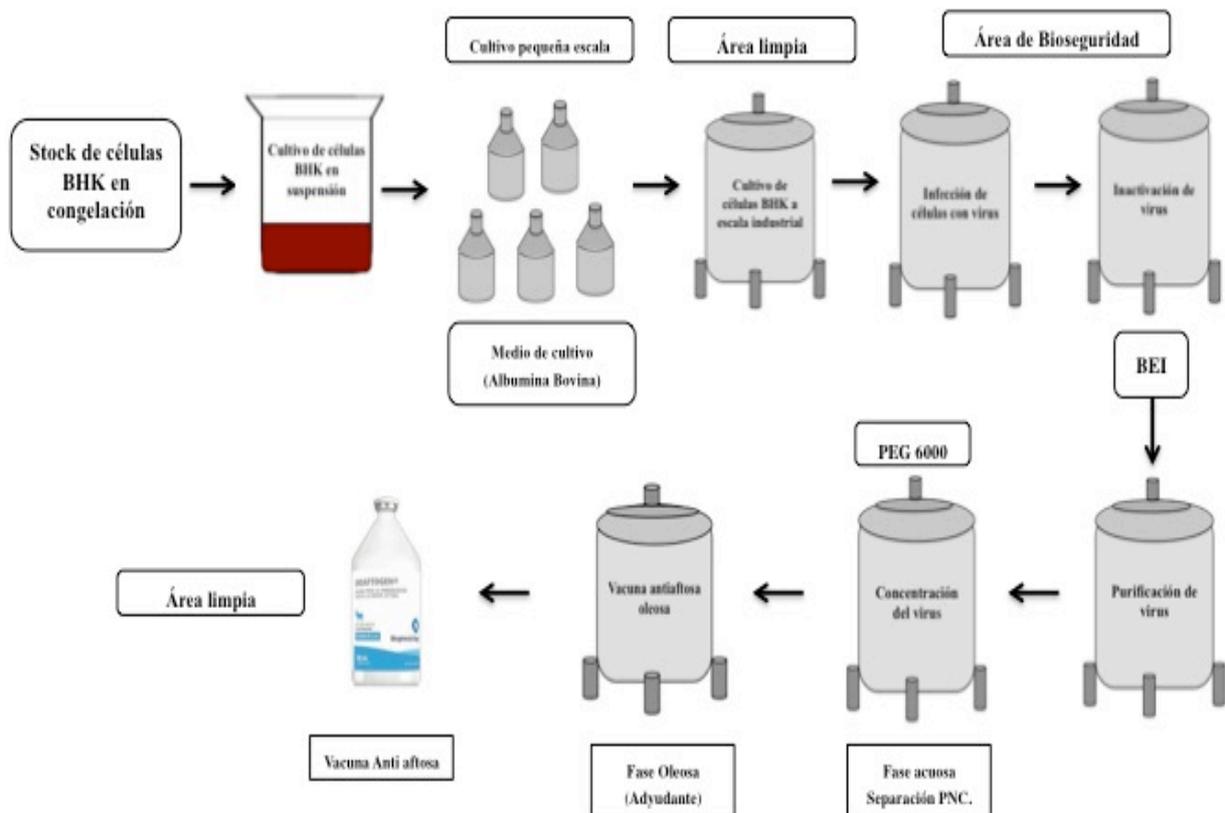


Figura 4. Diagrama del proceso de producción de la vacuna anti-aftosa. (Biogénesis, 2005).

Finalmente, cuando las capsides están concentradas y libres de contaminantes, en dilución adecuada se mezcla con un adyuvante oleoso. El sistema adyuvante oleoso produce una emulsión adecuada para bovinos, porcinos, ovinos y caprinos ⁸⁸.

3. 3. 2 Prueba de pureza a proteínas no capsidales

Dentro de las pruebas que el OIE recomienda que debe realizarse en la vacuna anti-aftosa se encuentra la prueba de pureza. Resolución N° 000151 (18 de enero de 2005) ¹³.

Prueba para anticuerpos contra PNC: el código de Salud de la OIE para animales terrestres estipula que los productores de vacunas deben garantizar que sus vacunas no induzcan anticuerpos contra las PNC. Requisito indispensable para la obtención de la licencia 4,12, 13,14,88.

El Instituto Colombia Agropecuario ICA sigue las directrices de la OIE para evaluar la pureza de la vacuna, el cual consiste en aplicar la dosis de vacuna recomendada por el laboratorio productor del lote de vacuna a un grupo de 30 bovinos machos entre 18 y 24 meses de edad, de áreas libres de FA sin vacunación. Adicionalmente se dejan dos bovinos controles sin vacunar. A los 30 días post vacunación, los 30 bovinos son revacunados con la misma dosis. Para que la prueba de pureza a las PNC se considere satisfactoria, todos los bovinos revacunados NO deben ser reactivos a anticuerpos contra las PNC por el sistema I ELISA 3ABC/EITB a los 30 días post vacunación, los resultados positivos son confirmados por el EITB (Inmunoblot). De este modo los resultados negativos de estas pruebas demostrarían que la vacuna no induce anticuerpos contra las PNC 13, 17. 86

3.4 Marco Referencial

3. 4. 1 Fiebre aftosa en Colombia.

En Colombia la FA ingresó en 1950 cuando animales infectados ingresaron al departamento de Arauca procedentes de Venezuela. A partir de este año, los serotipos A, O y C del virus, los mismos observados en Sudamérica han estado presentes. El serotipo A se diagnosticó por primera vez en 1951 en el Valle del Cauca y fue endémico durante décadas y el serotipo C se presentó en dos ocasiones en la capital del amazonas, A finales de los años sesenta y principios de los ochenta, con el ingreso de animales procedentes del Brasil.

Los serotipos A y O se difundieron por todo el país como consecuencia de la movilización de animales haciéndose endémico y su dinámica ha sido directamente influenciada por los

diferentes sistemas de producción bovina predominantes en algunas regiones. El serotipo C del virus fue erradicado mediante sacrificio sanitario y vacunación. En los años 90 se empezó el trabajo por la Certificación que otorga la Organización Mundial de Sanidad Animal – OIE.

En 1997, con la expedición de la Ley 395, se declaró de interés social nacional la erradicación de la Fiebre Aftosa, se implementó a nivel nacional el modelo que ya había sido probado en la Sabana de Bogotá, Valles de Sibaté y Chiquinquirá, en el que el ICA conjuntamente con los ganaderos, empresas productoras del biológico y otras entidades del sector agropecuario llevaron a cabo la vacunación de manera directa. Dicha Ley fue desarrollada por el Decreto 3044 de 1997 y la Resolución ICA 1779 de 1998. En este mismo año fue otorgado al departamento de Chocó como libre de FA sin vacunación. Durante ese tiempo se presentaron dos brotes, los cuales fueron controlados oportunamente. En mayo de 2009, el país recibió de la Organización Mundial de Sanidad Animal, la certificación del país libre con vacunación.

3.4.2 Situación actual de fiebre aftosa en Colombia.

En junio de 2017, se presentó un nuevo brote que fue confirmado por el laboratorio nacional de diagnóstico animal del ICA, donde reporto primero dos casos, uno en Tame (Arauca) y otro en Yacopí en Cundinamarca. Y luego reporto otros dos en el área de San Faustino, en Norte de Santander y en zona rural del municipio de Tibacuy (Cundinamarca), los cuales los atribuyen a la entrada incontrolada de ganado del país vecino Venezuela donde no tienen control de la enfermedad, los entes correspondientes tomaron rápidamente las medidas de control y de nuevo se recupero el estatus dejando las zonas de contención en estudio para poder reintegrarlos también.

En abril de 2018, en plena zona de contención, reapareció la fiebre, pero en esa ocasión Colombia mantuvo su estatus. Sin embargo, el 27 de septiembre se supo de la existencia de la zona de un foco de la enfermedad en un predio ubicado en la zona rural de Sogamoso. El hato estaba conformado por 18 animales, de los cuales una vaca mayor de tres años presentó signos clínicos: desprendimiento de epitelio de la lengua, salivación – babeo, entre otros, compatibles con la fiebre aftosa.

Mapa del estatus oficial de fiebre aftosa de los Miembros de la OIE

Última actualización mayo de 2019

Haga click en la region para aproximar el mapa

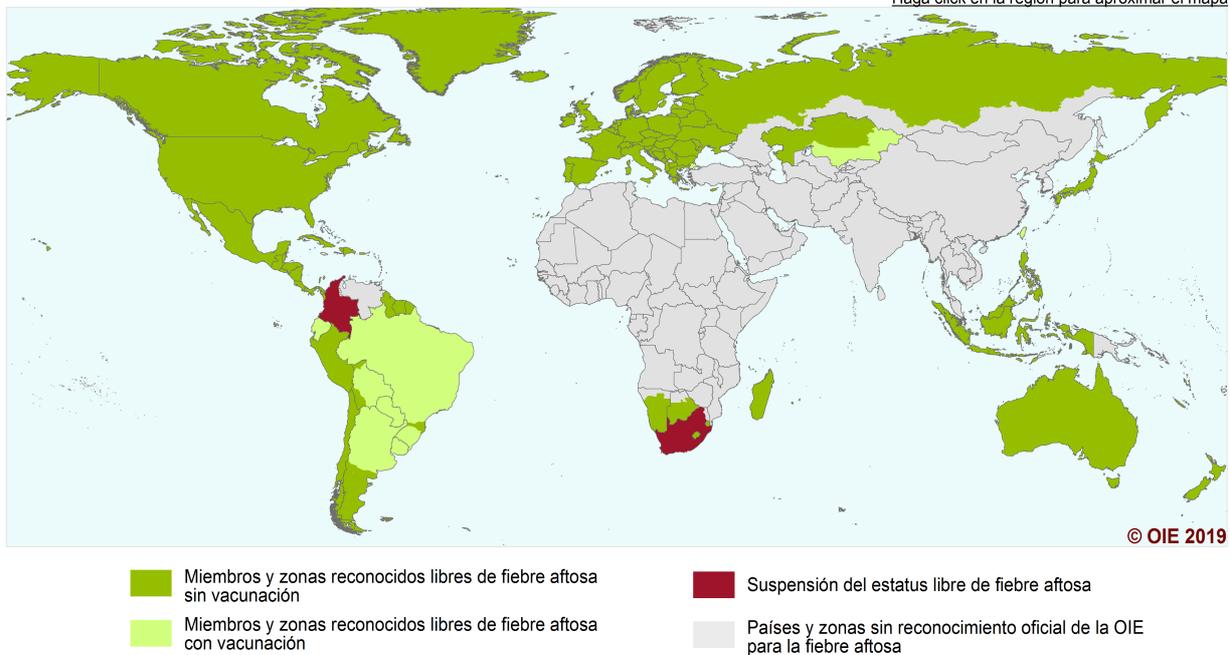


Figura 5. Mapa del estatus oficial de fiebre aftosa en los países miembros de la Organización Mundial de Salud Animal (OIE). Actualización Mayo de 2019. <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/estatus-sanitario-oficial/fiebre-aftosa/es-fmd-carte/>

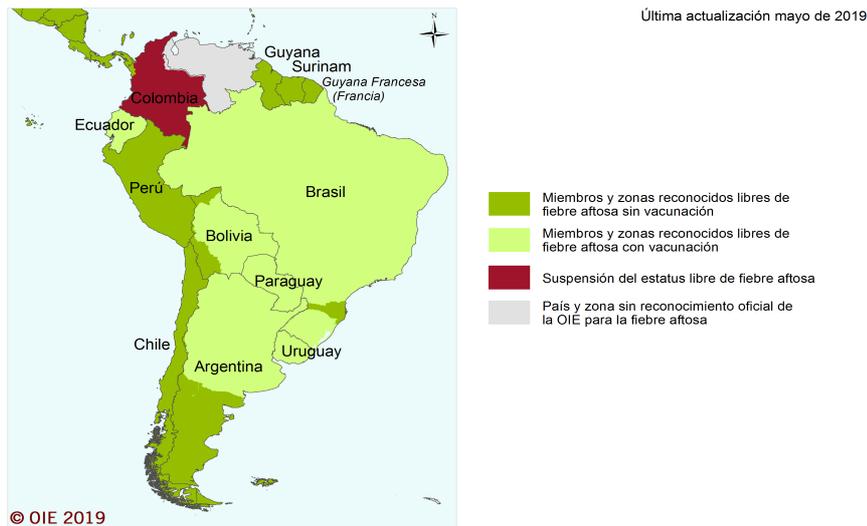


Figura 6. Mapa del estatus oficial de fiebre aftosa en América del Sur. (OIE, 2019)

El Laboratorio Nacional de Diagnóstico Veterinario del ICA, realizó pruebas de análisis molecular (PCR) que resultaron positivas y efectuó el aislamiento del VFA, el cual se identificó como del Serotipo O. El virus también fue aislado de otros dos animales del mismo predio, los cuales estuvieron en contacto con el animal enfermo, este hecho origina la pérdida de estatus del país libre de aftosa (Figura 5 y 6).

3. 4. 3 Impacto económico

Esta crisis de aftosa ha ocasionado pérdidas estimadas en \$750.000 millones de pesos entre costos directos e indirectos al 2018 para el País (Ver figura 7). Las pérdidas directas se deben a la muerte de animales y a la disminución de la producción. Las pérdidas indirectas se deben al costo de prevenir las enfermedades y luchar contra ellas. El programa nacional de FA de Colombia mantiene sus estrategias de vigilancia y control, así como una diplomacia sanitaria, mientras se siguen desarrollando las metodologías de diagnóstico, zona de contención y control de vacunas bajo los estándares recomendados por la OIE, según las recomendaciones consignadas en el capítulo 8.5 del Código de los Animales Terrestres y el capítulo 1.5 del

Manual de Pruebas Diagnósticas y de las vacunas para los Animales Terrestres de esta misma organización, sobre los que se fundamenta el proceso de erradicación y solicitud para el reconocimiento de su estatus.

Ítem	2017 Millones de US\$	2018 Millones de US\$	Total Millones de US\$
Caída del precio en el mercado interno	34,1 Julio y Agosto	---	34,1
Disminución en el consumo interno de carne	44,7 Julio y Agosto	---	44,7
Caída estimada en las exportaciones de carne	17	56	73
Caída en las exportaciones de animales vivos	15	20	35
Caída en las exportaciones de leche.	1	3	4
Costos por indemnizaciones por sacrificio sanitario.	1,4	---	1,4
Costos por traída de expertos internacionales.	1,1	2,2	3,3
Costos operativos y administrativos de emergencia	0,43	0,21	0,64
Total	114,7	81,41	196,14

Figura 7. Tabla de pérdidas estimadas del sector ganadero valoradas en dólares. Cifras en pesos valoradas con tasa de cambio de \$3.038 x dólar.

Actualmente, en los lugares donde se presentaron los brotes de la enfermedad se utilizó el sacrificio de los animales infectados o expuestos (rifle sanitario), y como medida de control y vigilancia se tiene establecida una zona de contención que incluye algunos municipios de los departamentos de Cundinamarca, Boyacá, Casanare y Arauca. Además desde el 29 de octubre de 2018 se inició un nuevo ciclo de vacunación, con censo predio a predio, continuando el 14 de enero del presente año, donde a la fecha se han vacunado a 3.121.978 bovinos en 116.960 predios en todo el país ¹⁶.

4. OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

- Purificar una proteína no capsidal del virus de la fiebre aftosa, para inducir la producción de anticuerpos policlonales en cabras *in vivo* y medir la actividad biológica por métodos de inmunodetección.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Determinar las mejores condiciones para la purificación de una de las proteínas no capsidales, para la producción de anticuerpos policlonales.
- Evidenciar la reactividad de los anticuerpos policlonales contra la proteína purificada para monitorear posibles reacciones aplicando una prueba inmunoenzimática.
- Realizar una curva estándar a partir de ensayos preliminares con la proteína purificada con el fin de evaluar y estimar la concentración de la misma.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material Biológico

5. 1. 1 Cultivo de virus VO1C y VA24C.

Se utilizaron dos serotipos del VFA O1/Campos y A24 /cruzeiro, cultivados en células de riñón de hámster BHK-21 para la producción de vacunas. El cultivo de virus fue suministrado por el laboratorio LIMOR DE COLOMBIA de manera inactiva usando bromuro de etilenimina (BEI).

5. 1. 2 Sobrenadante del Concentrado con polietilenglicol.

El concentrado se obtiene cuando el cultivo de virus es tratado con polietilenglicol (PEG) que precipita las capsides del virus, al fondo del bioreactor dejando en el sobrenadante las proteínas pequeñas como las PNC. Por eso es importante su monitoreo a fin de ver si están las PNC presentes y desde esta suspensión poder purificarlas.

5.2 Fase I. Proceso de purificación de los Antígenos de las proteínas no Capsidales.

Dentro de esta fase se encuentran los métodos, que hacen parte de todo lo que interviene en la purificación de la PNC, con el objetivo de que la proteína purificada se pueda utilizar para la inducción de anticuerpos policlonales.

5. 2. 1 Concentración, Diálisis, Cromatografía de intercambio aniónico.

El cultivo de virus, se concentró en una celda de ultrafiltración AMICON[®], con una membrana Millipore[®] de 10.000 Daltons (Da), la muestra de 1.200 ml se llevó a 60 ml con una concentración final de 32 mg / ml. En la misma celda se dializó la muestra 4X con 240 ml de solución tampón (20 mM de Na₂HPO₄ y 20 mM de NaCl con 0,05% de Tween) pH 7.4, la muestra se alícuoto y se guardó a -20°C. De la solución dializada se inyectó 160 mg

(5 ml) a la columna de Sepharosa-DEAE (dietil-amino-etanol) (2.5×10 cm) previamente equilibrada con la misma solución utilizada en la diálisis y que a su vez fue utilizada para lavar la columna después de inyectada la muestra, hasta que la Absorbancia a 280 nm (A_{280}) cayó a 0.0. Las proteínas retenidas en la columna fueron eluidas con un gradiente salino de 20 mM a 800 mM de NaCl en la misma solución tampón y colectado en fracciones de 7.5 ml por tubo, la concentración de cada tubo fue cuantificada a A_{280} , en un equipo NanoDrop 2000. Las fracciones con mayor absorbancia se monitorearon por electroforesis, se tomó nuevamente la A_{280} y se determinó la concentración final, adicionalmente, para corroborar los resultados, se utilizó el método de ácido bicinconinico⁸⁹.

5. 2 .2 Electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis SDS-PAGE al 15% se realizó de acuerdo al método de Laemmli ⁸⁹. Los picos obtenidos de la cromatografía se mezclaron con el tampón de muestra (20% Glicerol, 2% SDS, 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 10% β -mercaptoetanol, y 0.05% de azul de bromofenol) en un volumen 1:1 (vol / vol); luego fueron tratados térmicamente por 5 min a 100 °C. De cada pico se aplicó 10 μ g en los respectivos pozos del gel y se corrió a 200 Voltios. Las proteínas fueron visualizadas utilizando la coloración azul brillante de Coomassie y con nitrato de plata ⁹⁰.

Los pesos moleculares de las bandas se calcularon utilizando el software Image LabTM, utilizando como referencia un marcador de peso molecular de bajo rango de Biorad (Ref.: 1610304. Fosforilasa b (97.4 KDa), seroalbúmina bovina (66.2 KDa), ovoalbúmina (45 KDa), anhidrasa carbónica (31 KDa), inhibidor de tripsina de soja (21.5 KDa) y lisozima (14,4 KDa). Con este método se plantea monitorear los productos purificados en la sección anterior y verificar si se encuentra el producto de interés.

5. 2. 3 Electroforesis bidimensional.

Para realizar la electroforesis en dos dimensiones (2D)⁹¹, la muestra de PNC 3D (50 µg), se disolvió en un tampón de rehidratación (Urea 8M, CHAPS 2 %, DTT 50 mM, Anfolitos 3/10, trazas de azul de bromofenol en agua desionizada), hasta completar 125 µl, volumen recomendado de carga para una tira IPG de 7 cm, que contenía un rango lineal de pH de 3 a 10; tira que fue hidratada por 12 horas. Después de la rehidratación, se llevó a cabo el isoelectroenfoco, usando el equipo PROTEAN 12 IEF SYSTEM de Biorad, utilizando el siguiente protocolo: 20 min a 250 V, 2.5 h a 4000 V, hasta alcanzar 10.000 V / hora. Las tiras IPG (Immobilized pH gradient), se sometieron a reducción y alquilación, incubándolas durante 10 min en una solución con 8 M de urea, 30% de glicerol, 2% de SDS y 125 mM de DTT, y 10 min en la misma solución tampón en la que se reemplazará el DTT por 125 mM de iodoacetamida. Después de esto se realizó la separación de proteínas de acuerdo con su peso molecular colocando la tira equilibrada sobre el gel de poliacrilamida al 12.5 % en presencia de SDS y cubierto con overlay agarose. La electroforesis se llevó a cabo usando el sistema Miniprotean a un voltaje de 200 Voltios. Se tiñó con nitrato de plata y se documentó con el sistema Gel Doc XR+ de Biorad. Con este procedimiento se logró ver si la proteína de interés tiene una o varias isoformas.

5. 2. 4 Secuenciación de las proteínas

El procedimiento se realizó por espectrometría de masas MALDI-TOF y Electro spray trampa iónica (LTQ-Velos) y se llevó a cabo por el servicio de Proteómica del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO), en Madrid España^{92, 93, 94, 95}. Su metodología se basa primero en una digestión de las bandas del gel, *in situ* con tripsina. Luego con un espectrómetro de masas en modo reflector de iones positivos, se hace la identificación de los picos y la asignación monoisotópica de las masas de los péptidos de forma automática

utilizando el software MASCOT (<http://matrixscience.com>) que luego se coteja en las bases de datos NCBI <http://www.ncbi.nih.gov>. De no identificarse por este método se utiliza la fase inversa cromatografía líquida-análisis LC-MS / MS, donde se utiliza cromatografía de fase inversa usando un gradiente (Disolvente A: ácido fórmico al 0,1% en agua, disolvente B: ácido fórmico al 0,1%, acetonitrilo 80% en agua). La identificación de péptidos se lleva a cabo utilizando el programa de análisis de datos SEQUEST, La búsqueda en base de datos se llevó a cabo contra uniprot-mammalia. Este método de secuenciación ayuda a identificar si se encuentra dentro del producto purificado una PNC.

5.3 Fase II: Proceso de Inmunización y purificación de anticuerpos policlonales.

En esta fase se encontrarán los métodos descritos para encontrar el mejor método para la inducción y purificación de anticuerpos contra la proteína de interés, con la finalidad de demostrar su inmunodetección.

5.3.1 Inmunización en cabras con el antígeno no capsidal.

Este estudio se realizó con el aval del Comité de Ética de la Universidad de Pamplona del 25 de mayo de 2015, según acta 003 y con la colaboración de un médico veterinario en la finca Villa Marina de propiedad de la Universidad de Pamplona, se diseñó un esquema de inmunización para dos cabros con la proteína purificada 3D. La proteína fue emulsionada utilizando la formulación oleosa montanide y el adyuvante incompleto de Freund.

La cantidad del inmunógeno utilizado fue de 200 µg / ml. Cada animal fue inmunizado con 2 ml (400 µg), antes de la primera inmunización se le tomaron pruebas de sangre a los cabros como control negativo. La mezcla del inmunógeno con el adyudante fue administrado por vía subcutánea los días 0, 7, 14, 21 ⁹⁶.

5. 3. 2 Obtención de suero hiperinmune.

Concluido el esquema de inmunización, el día 30 y el día 90, con ayuda de un médico veterinario se les extrajo 400 ml de sangre con anticoagulante a cada cabro. El suero se obtuvo por centrifugación de la sangre a 700 G gravedades / 10 minutos a +4°C, en una centrífuga KR25i Jouan de mediana velocidad, el suero fue decantado y conservado a -20°C hasta su utilización.

5. 3. 3 Purificación de anticuerpos policlonales.

El plasma del animal inmunizado, se precipitó con sulfato de amonio en polvo, aplicándole 27 gramos por cada 100 ml de muestra, a una temperatura de 3-4°C, el cual fue agregado en pequeñas cantidades y en constante agitación. Luego se centrifugó a 6.000 g por 15 minutos, se descartó el sobrenadante ^{97, 98, 99}. El precipitado se lavó tres veces con una solución de sulfato de amonio 2 M/L y se centrifugó bajo las mismas condiciones que antes. El precipitado se disolvió en 200 ml de agua, y se transfirió la solución a una membrana para diálisis, (Dialysis tubing de Fisherbrand™). La muestra se dializó alternadamente así, primero por 12 horas con agua y luego por 12 horas con 70 mM de NaAc pH 5.5, dos veces cada uno, luego se centrifugó. Al sobrenadante se le ajustó el pH a 8.5 con 0.4 M NaHCO₃, 2.0 M Na₂CO₃, se tomó la A₂₈₀, y la concentración se determinó utilizando como coeficiente de absorción 1.38 ¹⁰⁰.

La solución proteica fue inyectada a una columna que contenía 2 ml de Sefarosa-proteina A (0.8 x 4 cm). La columna se lavó con la solución tampón (10 mM sodio fosfato, 0.15 M NaCl, pH 8.2). hasta que la A₂₈₀ fue 0.0 y las IgG fueron eluidas de la columna con la solución tampón 0.1 M sodio citrato, pH 3.0. La solución de las IgG fue neutralizada con 1 M de NaHCO₃, a un pH entre 6 – 7 ¹⁰¹.

La discriminación de las IgG policlonales contra la proteína 3D se hizo en una columna de propileno de 1.5 x 12 cm, con la matriz de afinidad de Sefarosa-proteína-3D. Esta matriz fue elaborada siguiendo el protocolo del fabricante GE Healthcare (Instructions 71-7086-00) para activar la Sepharosa con la proteína 3D purificada. Una vez activada esta matriz con nuestra proteína de interés, se equilibró con 20 mM fosfato y 100 mM NaCl pH 7.2; se le adicionaron 10 ml de la solución de IgG (14 mg) y se lavó con la misma solución tampón hasta que A_{280} fue de 0.0, la elución se hace con 100 mM de glicina / HCl pH 2.7, la solución de las IgG fue neutralizada con 1 M de NaHCO_3 , a un pH de 6.0.

5.3.4 Inmunodifusión.

La especificidad de las IgG policlonales, se evaluó mediante la técnica de inmunodifusión doble ¹⁰². Brevemente, se utilizaron placas con agar al 1%, a las que se les realizaron una serie de perforaciones distribuidas en forma equidistante. Las perforaciones se llenaron en el centro con 10 μl del antígeno, proteína 3D purificada (10 μg) y en las cuatro esquinas con 10 μl del IgG (10 μg). Las placas se incubaron a 4 °C, por un tiempo estimado de 24 a 48 horas en cámara húmeda.

5.3.5 Western Blot

Después de realizar la electroforesis de la proteína 3D en las condiciones previamente descritas, se hizo la transferencia de esta, a una membrana de PVDF (polifluoruro de vinilideno) del mismo tamaño del gel. Todas las burbujas de aire entre el gel y la membrana se eliminaron cuidadosamente. Se usó una cámara Mini Trans-Blot® Cell con solución tampón de transferencia (25 mM Tris-HCl pH 8.3, 190 mM glicina, 20% (V/V) metanol, 0.1% (P/V) SDS) a 100 voltios por 8 horas a 4°C ¹⁰³.

Posteriormente la membrana se bloqueó con una solución tampón que contenía 20 mM de fosfato, 150 mM de cloruro de sodio y albumina al 3 % BSA (PBS-BSA) por una hora a temperatura ambiente. Luego de lo cual la membrana fue incubada con la IgG contra la proteína 3D diluida (1:1000 en PBS-BSA) a una concentración final de 1 µg / ml, y fue incubada durante 3 horas a 37 °C. Luego se adicionó la anti IgG conjugada con peroxidasa del rábano, HRP (por sus siglas en inglés) de Sigma aldrich, diluida 1:3000 con PBS-Tween 20, se incubó por 1 hora bajo constante agitación. Se reveló con un kit comercial de substrato de peroxidasa (OPTI-4CN 4-Cloro naftol) de Biorad. La reacción se detuvo agregando agua desionizada.

5. 4 Fase III: Proceso de sensibilización y Elaboración de una Curva estándar para un ensayo inmunoenzimático (ELISA)

Esta fase se realizó con la finalidad sensibilizar la placa con el anticuerpo purificado, y así lograr hacer una curva estándar con el antígeno de interés.

5. 4. 1 Sensibilización de placas para ELISA

Se sensibilizaron placas de polipropileno Nunc™ con los anticuerpos específicos contra la proteína 3D, diluidos a una concentración de 10 µg/ml con una solución amortiguadora carbonato-bicarbonato 0,05 M pH 9.6, aplicándose 100 µl en cada uno de los pozos de la placa, donde se incubó de 16-24 horas a temperatura ambiente entre 15-18 °C, según protocolo Guesdon and S. Avrameas ^{104, 105}

5. 4. 2 Procedimiento ELISA (Curva de calibración).

Después de la incubación las microplaquetas se lavan con PBS con Tween 20 al 0,05%

(PBS-T) cuatro veces y se almacenan en la misma solución tampón de 4-8 °C, recubiertas con cinta de sellado hasta su posterior uso. La placa fue bloqueada con albúmina al 1% durante 2 h a 37 °C y posteriormente lavada con PBS- T dos veces ^{104,105, 106}

El antígeno purificado (Proteína 3D), se preparo realizando diluciones seriadas (2:2) en PBS-T, partiendo de una concentración de 1 µg/µl, para obtener concentraciones que van de 100 – 0,125 ng / ml y un control negativo con solo solución tampón, por 2h a 37 °C.

Luego fue lavado de nuevo con PBS-T tres veces. A continuación, se adicionó a cada pozo el anticuerpo conjugado con peroxidasa en un dilución 1:3000 en PBS-T e incubado durante 1 h a 37 °C. El exceso de anticuerpo secundario fue retirado con tres lavados. Finalmente, la detección se llevó a cabo mediante la adición de 50 µl por pozo de una solución de 1mg /ml de Orto–fenilendiamina (OPD) disuelto en H₂O₂ al 0,03 % y solución tampón fosfato/citrato pH 5.0, que contiene 25 mM de ácido cítrico y 50 mM de Na₂PO₄. Cuando se evidenció la formación de un color amarillo intenso, la reacción se detuvo mediante la adición de 50 µl de H₂SO₄ 2,5 M. Los ensayos fueron realizados por duplicado y el procedimiento se realizó seis veces de manera independiente. La absorbancia se midió a 405 nm en un lector de ELISA, para las gráficas se tabuló el DO, el cual resulta de la diferencia de la absorbancia obtenida para los experimentos menos la absorbancia de los controles negativo.

5. 4. 3 Evaluación del rango lineal de la curva.

El intervalo de la curva se determinó mediante seis ensayos en los que se evaluaron, seis diluciones seriadas con factor dos, del suero hiperinmune purificado. En cada ensayo se proceso por triplicado cada dilución del antígeno. Se estableció el coeficiente de determinación y la desviación estándar. El ajuste se determinó mediante un análisis de regresión lineal.

6. RESULTADOS

6. 1 Purificación de los antígenos por cromatografía de intercambio iónico, serotipos A24 /cruzeiro (VA24C) en cultivo de virus (BHK-21).

El perfil cromatográfico obtenido para el proceso de purificación en el serotipo A24 /cruzeiro a partir de cultivo de virus, mostró tres picos: El pico I, se ve dividido en dos, pero ambos mostraron el mismo contenido proteico en la electroforesis por lo que se estableció como uno solo, el cual corresponde a las proteínas que no interaccionan con la matriz de sefarsa-DEAE, eluyendo directamente con la solución tampón de lavado; los picos II y III corresponden a las proteínas retenidas en la matriz, las cuales eluyeron con el gradiente salino que va de 20 a 800 mM de Cloruro de sodio (Fig. 8).

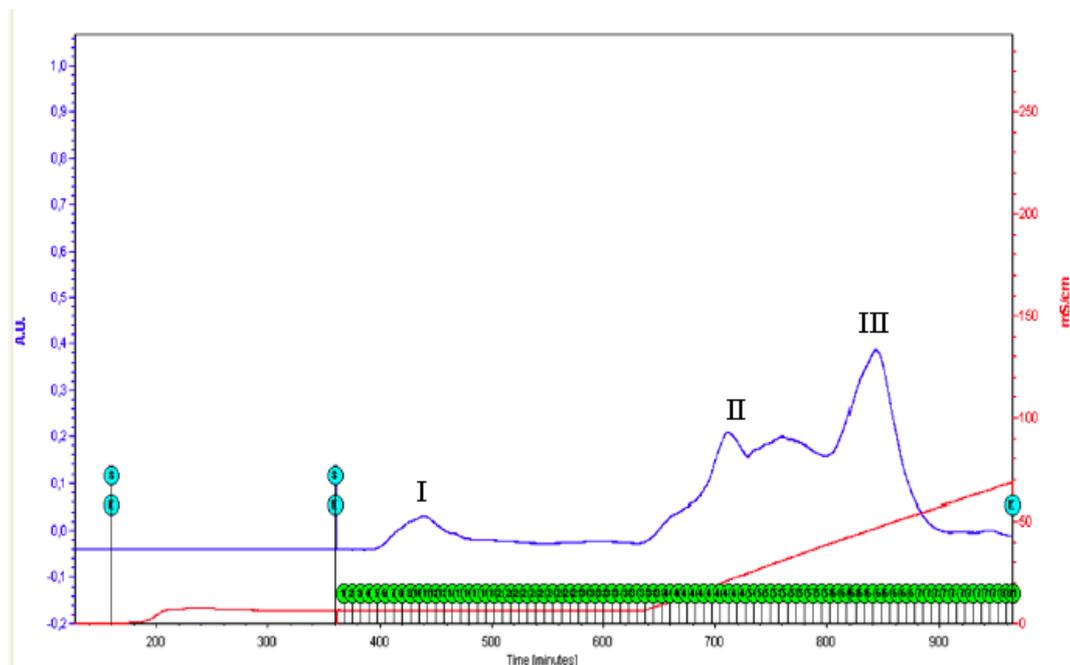


Figura 8. Perfil cromatográfico obtenido en la cromatografía de intercambio iónico a partir del cultivo de virus del serotipo VA24C del VFA, Pico I (Proteínas no retenidas en la matriz); Pico II y III (Proteínas eluidas por el gradiente salino).

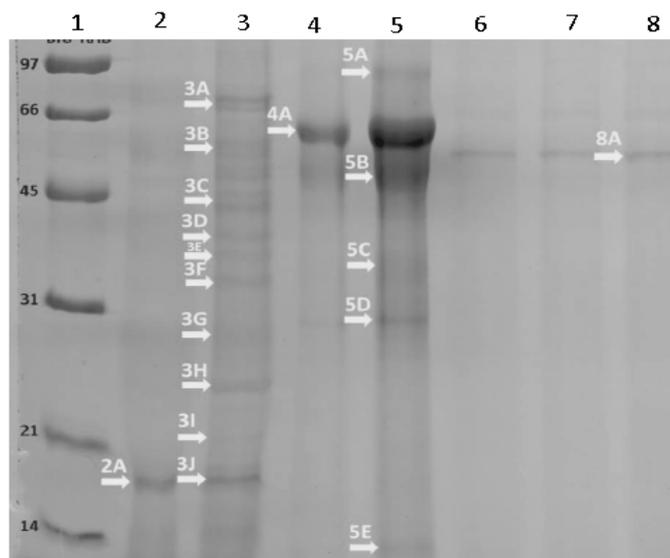


Figura 9. Electroforesis SDS PAGE al 12.5% separación cromatográfica serotipo VA24C. Carril 1: Marcador de peso molecular (kDa) ; Carril 2 y 3: Proteínas presentes en el Pico I ; Carril 4 y 5: Proteínas obtenidas en el Pico II ; Carril 6, 7, 8: Proteínas obtenidas en el Pico III.

El **pico I** (figura 8), se monitoreo por electroforesis observando 10 bandas con pesos moleculares heterogéneos entre 20 a 70 kDa (Carril 2 y 3 , Figura 9). La cantidad de antígeno de este pico fue de 8 mg. Algunas de estas bandas fueron identificadas por la técnica de MALDI-TOF, otras como el espectro no estaba muy claro fueron identificadas por la técnica de LC-MS/MS (LTQ_Velos) trampa iónica, utilizando el motor de búsqueda Sequest (Proteome Discoverer 1.3), resultando todas las bandas pertenecientes al hospedador del orden rodentia.

El **pico II**, se le determinó una masa proteica de 10 mg de proteína total, las cinco bandas presentes fueron identificadas como albumina bovina (Carril 4 y 5, Figura 9), inclusive las de menor peso molecular, clara indicación de degradaciones enzimáticas en la solución.

A el **pico III**, se le determinó una masa proteica de 4.8 mg; en la electroforesis se observa una sola banda (Carril 6, 7, 8, Figura 9); para demostrar aún mas su pureza, este pico fue teñido con nitrato de plata que es una técnica mas sensible que la tinción con azul de Coomassie, demostrándose igualmente la misma banda sin contaminantes (Figura 11A). Su identificación no se logró por la técnica de MALDI-TOF pero si fue identificada por la técnica de Electro spray trampa iónica (LTQ_Velos), como **RNA-directed RNA polymerase 3D-POL (P3D-POL)**, con la secuencia **SLGQTITPADK** (Figura 10), ubicada entre los a.a. 2222 al 2232 que se encuentra dentro de la longitud de los 470 a.a que abarcan a esta proteína. Además su peso molecular fue determinado en 51 KDa, utilizando como referencia un marcador de peso molecular de bajo rango y el software Image Lab™ (Figura 11 B).

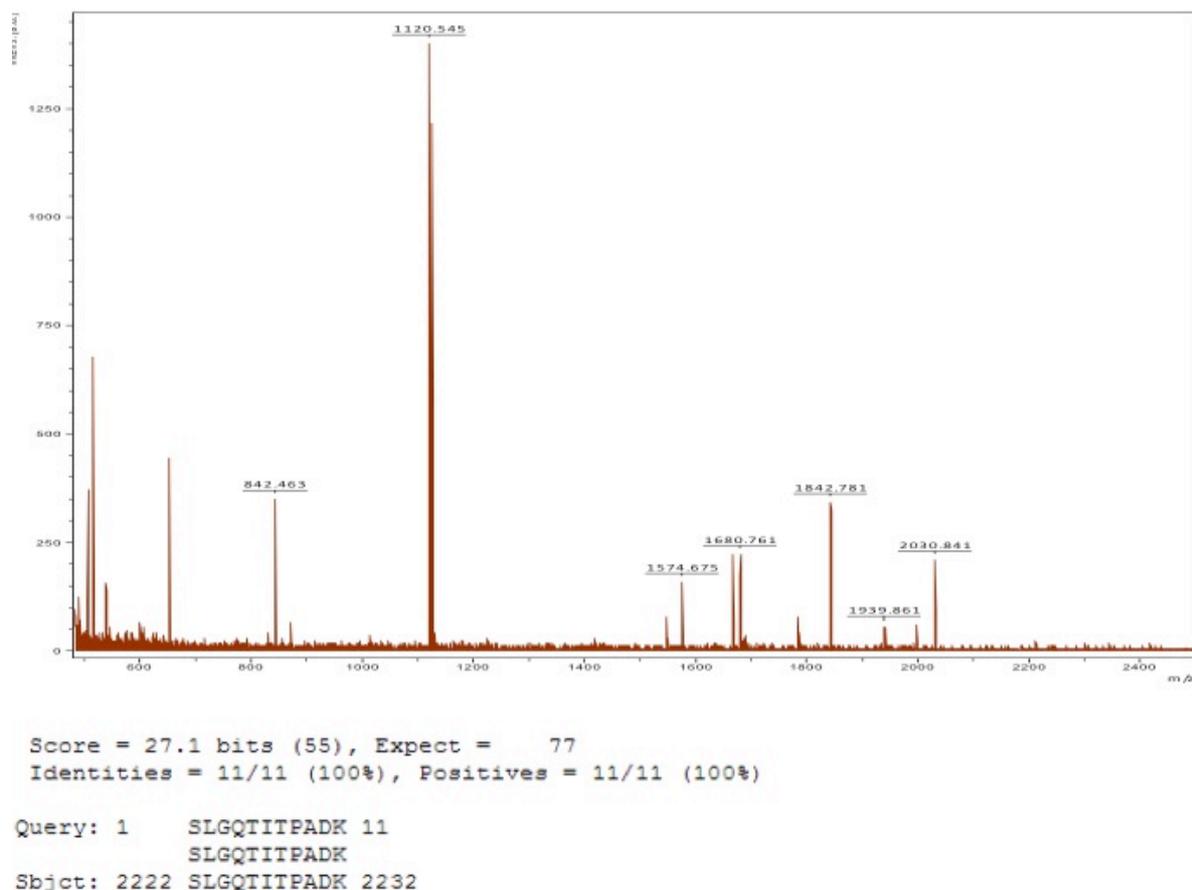


Figura 10. Espectro de MALDI-TOF de la proteína identificada con PNC 3D.

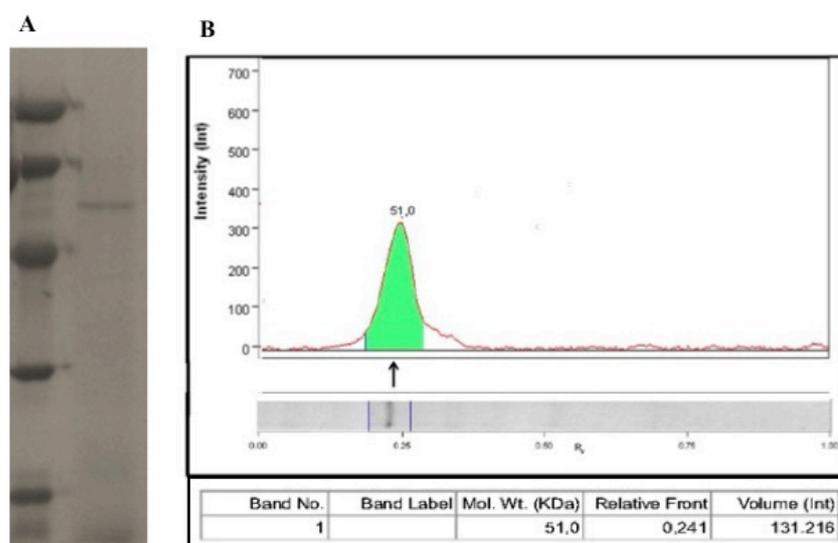


Figura 11. A. Proteína 3D teñida con nitrato de plata. B. Peso molecular proteína 3D suministrado por software Image Lab™.

6.1.1 Purificación de los antígenos por cromatografía de intercambio iónico, serotipos O1 /campus en cultivo de virus (BHK-21).

Esta muestra fue sometida bajo las mismas condiciones que el serotipo VA24C. El perfil cromatográfico obtenido fue muy similar al otro serotipo, tres picos donde el último sale en el gradiente salino (Figura 12). El serotipo VO1C desde su cuantificación se observó que tenía mayor concentración inicial de 40 mg, por lo cual al momento de la purificación se obtuvo mas cantidad de cada pico obtenido. En este serotipo también se identificaron proteínas pertenecientes al hospedador, albumina bovina y en pico III se identificó la proteína RNA polimerasa pero esta vez en complejo con la proteína 3B (Vpg), la cual también es una proteína no capsidal vinculada al genoma, unida covalentemente al extremo 5' del ARN viral de cadena positiva y actúa como cebador durante la síntesis de ARN.

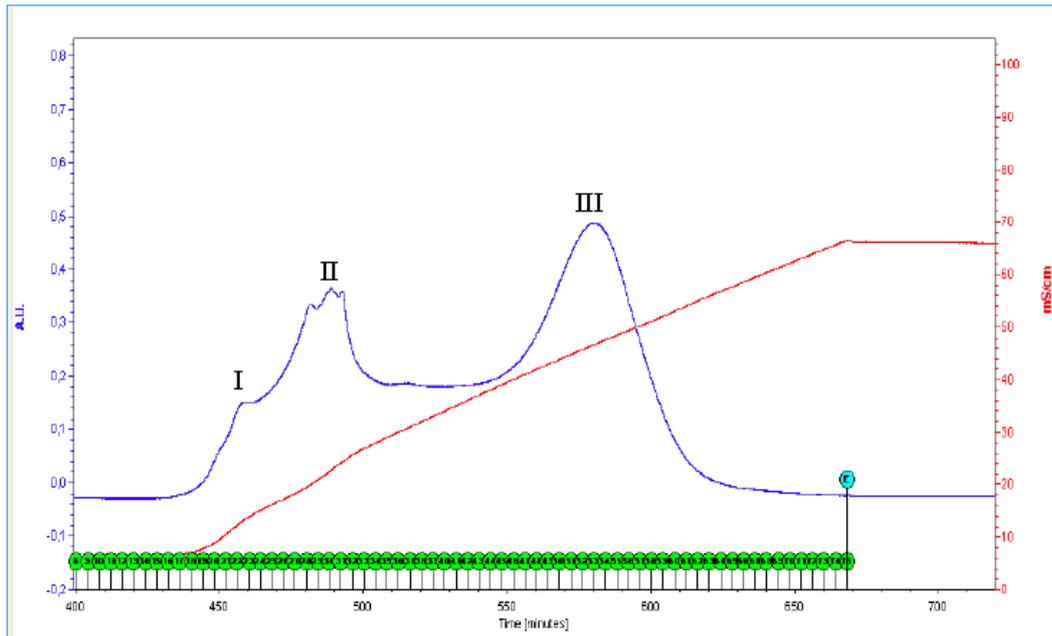


Figura 12. Perfil cromatográfico obtenido en la cromatografía de intercambio iónico a partir del cultivo de virus del serotipo VO1C del VFA, Pico 1 (Proteínas no retenidas en la matriz); Pico 2 y 3 (Proteínas eluidas por el gradiente salino).

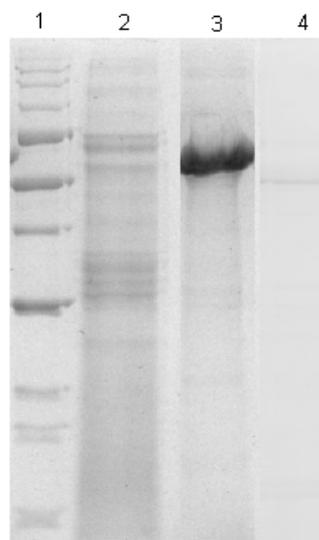


Figura 13. Electroforesis SDS PAGE al 12.5% Serotipo O1/Campos. **Carril 1:** Marcador de peso molecular; **Carril 2:** Proteínas obtenidas en el pico I; **Carril 3:** Proteínas obtenidas en el Pico II ; **Carril 4:** Proteínas obtenidas en el Pico III

6.2 Monitoreo del sobrenadante del concentrado con PEG.

Esta solución presento una alta concentración de proteína (50 mg/ml), la cual fue dializada en una solución tampón fosfato, y se monitoreo por SDS-PAGE, observando una sola banda de alrededor de los 66 KDa (Figura 14), la cual también fue secuenciada y fue identificada como albumina bovina, por lo cual como estaba sola no hubo necesidad de pasarla por cromatografía de intercambio iónico. Esta etapa dentro del proceso de purificación ocurre cuando el PEG es agregado para separar las capsides de las PNC.

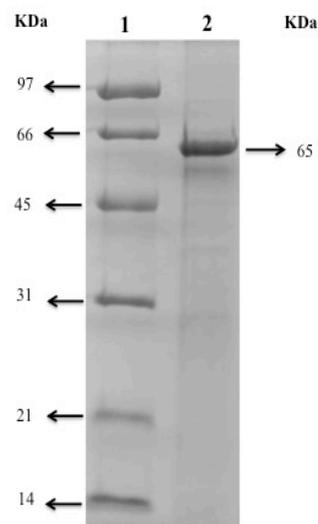


Figura 14. Electroforesis SDS PAGE al 12.5%, Sobrenadante del concentrado con PEG, durante el proceso de producción vacunal. Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: Albumina Bovina.

6.3.1 Electroforesis Bidimensional.

La 2D de la proteína PNC 3D ya purificada, se realizo usando isoelectroenfoco (IEF) en la primera dimensión y un gel denaturante (SDS-PAGE) en la segunda dimensión (Figura 15), revelando características interesantes de la proteína, donde se observa claramente tres isoformas, en un rango de pH aproximado entre 5 y 6, abarcando el área del punto Isoeléctrico teórico de la proteína 3D (pH 5. 92), el cual concuerda con el suministrado por la base de datos Uniprot.

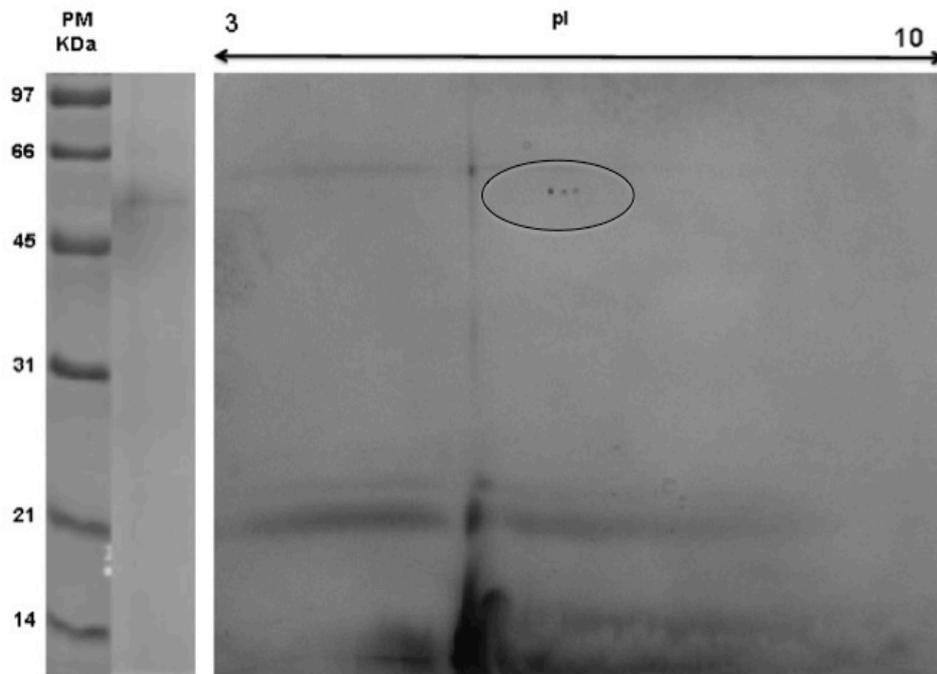


Figura 15. Mapa electroforético bidimensional de la proteína 3D.

6. 3. 2 Predicción de los Epitopos del antígeno PNC 3D.

La predicción de los epítopes de la proteína 3D, se realizó por medio de un programa que simula *in silico* las principales regiones antigénicas de la proteína, esto con fin de verificar si la secuencia de aminoácidos que fue identificada en MALDI TOF y trampa iónica de la proteína de interés, coincidía con los epítopes que el programa predice.

La PNC 3D tiene siete sitios de flexibilidad antigénica, lo que concuerda con algunos autores que indican que esta proteína es altamente antigénica (Figura 16). El último sitio entre los aminoácidos 364-372 (**ITPADKSDK**), coincide con un fragmento del péptido que fue secuenciado de la proteína 3D purificada (Figura 10), en los a.a 364-369 **ITPADK**, lo que indica que es un sitio que facilita el anclaje con las regiones complementarias del Ac.

```

GLIVDTRDVEERVHVMRKTKLAPTVAHGVFNPEFGPAAALSNKDPRLNDGVVLDEVIF
SKHKGDTKMSEEDKALFRRCAADYASRLHSVLGTANAPLSIYEAIKGV DGLDAMEP
DTAPGLPWALQGKRRGALIDFENGTVGPEVEAALKLMEKREYKFACQTF LKDEIRP
MEKVRAGKTRIVDVL PVEHILYTRMMIGRFCAQMHSNNGPQIGSAVGCNP DVDWQR
FGTHFAQYRNVWDVDYSAFDANHCSDAMNIMFEEVFRTEFGFHPNAEWILKTLVNT
EHAYENKRITVEGGMPSGCSATSIIINTILNNIYVLYALRRHYEGVELDTYTMISYGDDI
VVASDYDLDFEALKPHFKSLGQTITPADKSDKGFVLGHSITDVTFLKRHFHMDYGTG
FYKPMASKTLEAILS FARRGTIQEKLISVAGLAVHSGPDEYRRLFEPFQGLFEIPSYRS
LYLRWVNAVCGDA 470 a.a

```

Figura 16. Predicción de Epítopes B de la proteína 3D, información obtenida por medio del programa Bcepred, En azul se encuentran los epítopes de la proteína identificados en el programa, en amarillo se encuentra la secuencia que fue identificada de la proteína 3D por trampa iónica. dentro de estas dos secuencia se encuentran seis aminoácidos que se encuentran dentro de la región antigénica (Flecha roja).

De esta región la mayor flexibilidad esta en los a.a 367- 369 (Figura 16), donde se observa un aumento en el valor en estos aminoácidos, en color azul, en especial en el 368 que es ácido aspártico (Ver Tabla 1).

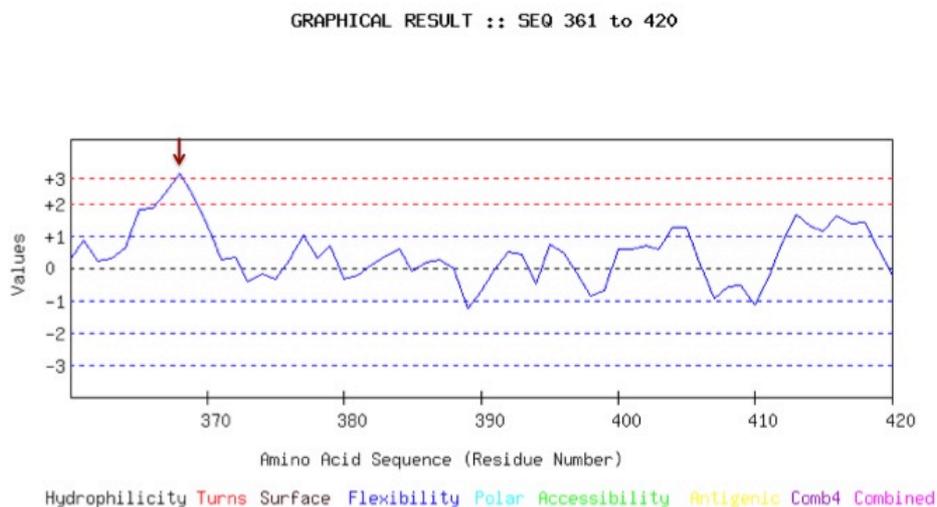


Figura 17. Grafica de resultados de flexibilidad de la secuencia de la proteína PNC3D.

Tabla 1. Aminoácidos con mayor flexibilidad de la secuencia del antígeno 3D

Número	Aminoácidos	Flexibilidad
367	Ala - A	2.323
368	Asp - D	2.950
369	Lys - K	2.237

Por medio del servidor, <https://www.swissmodel.expasy.org/>, se modeló la proteína PNC 3D con la secuencia descargada de la base de datos Uniprot <https://www.uniprot.org/uniprot/P03310>, donde se ubicó el aminoácido 360, el ácido aspártico, que es un determinante antigénico en la unión con el anticuerpo (Figura 17).



Figura 18. Modelado estructura PNC3D, loop donde se encuentra el aminoácido ácido aspártico (ASP), determinante antigénico.

6. 4 Inducción y purificación de anticuerpos policlonales a partir de un modelo caprino

La discriminación de los anticuerpos específicos contra la proteína 3D purificada, se logro por medio de una cromatografía de afinidad. En la Figura 18, carril 2 se observan los anticuerpos totales y en el carril 3 los anticuerpos específicos contra la PNC3D; en los dos carriles se observan, la cadena pesada y liviana de los anticuerpos que las caracteriza con pesos moleculares de 50 y 25 kDa.

La discriminación de los anticuerpos PNC 3D, se hizo por medio de la matriz sepharosa activada con la proteína 3D purificada, con la concentración de anticuerpos purificados se alcanzó a trabajar en la parte de la elaboración de una curva patrón.

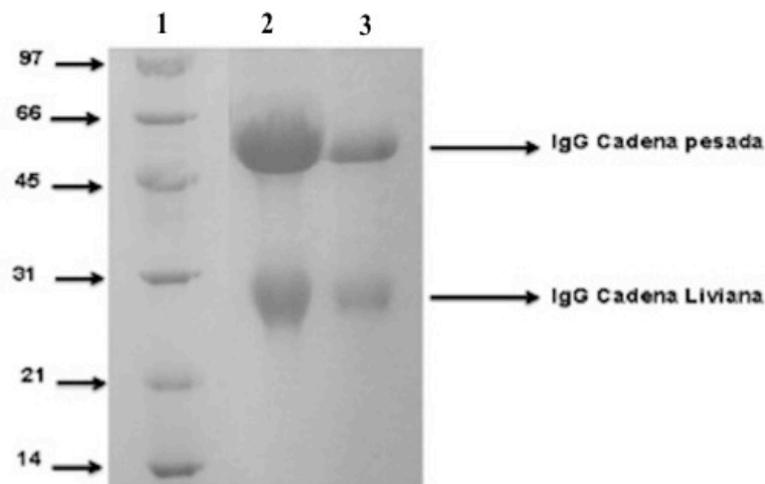


Figura 19. SDS-PAGE de los anticuerpos purificados por cromatografía de Afinidad. Carril1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Anticuerpos Totales ; Carril 3: IgG cargada con anticuerpos específicos.

6. 5 Pruebas de inmunogenicidad

Immunodifusión, método de Outcherlony

El test para detección de IgG específicos (método de Outcherlony) mostró las bandas de precipitación tipo romboidal, para las IgG del suero hiperinmune de las cabras obtenido en la inmunización, lo que indica que hubo interacción entre la PNC3D y su anticuerpo específico, (Figura 19).

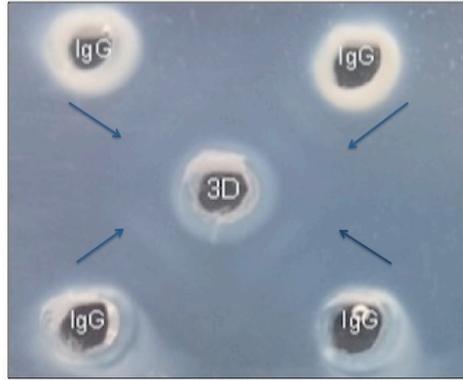


Figura 20. Inmunodifusión de la proteína 3D con IgG producidas en la cromatografía de afinidad sefarosa-3D.

6.6 Western Blot.

La evaluación de los anticuerpos obtenidos se llevó a cabo mediante ensayos de inmunodetección en Western Blot, (Figura 20). Se obtuvo una señal clara y evidente alrededor de 52 kDa en la membrana tratada con el anticuerpo Ac-PNC 3D.

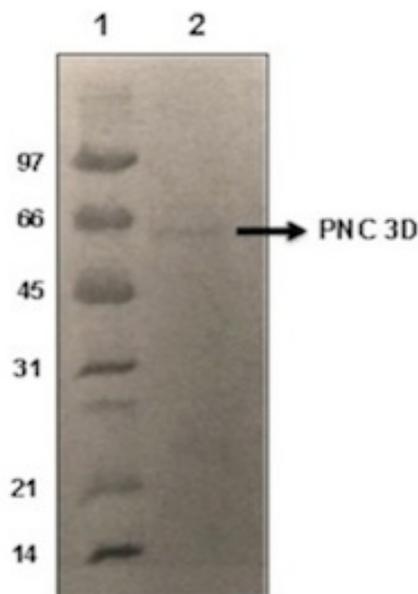


Figura 21. Western blot de la proteína 3D identificada por las IgG purificadas por afinidad de sefarosa-3D.

6.7 ELISA PNC 3D

Dentro del procedimiento se observó que hubo una buena sensibilización en la placa, la concentración de recubrimiento fue óptima (10 $\mu\text{g/ml}$), demostrando que el anticuerpo si interaccionó con las diferentes concentraciones del antígeno, por eso las diferentes intensidades de color que se desarrollaron como se ve en la figura 21.

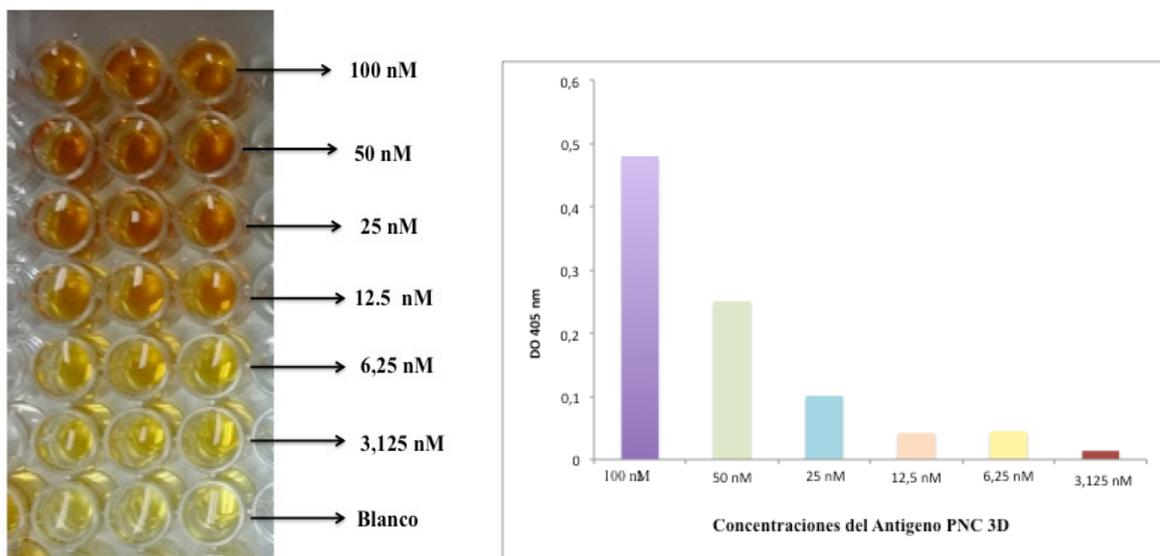
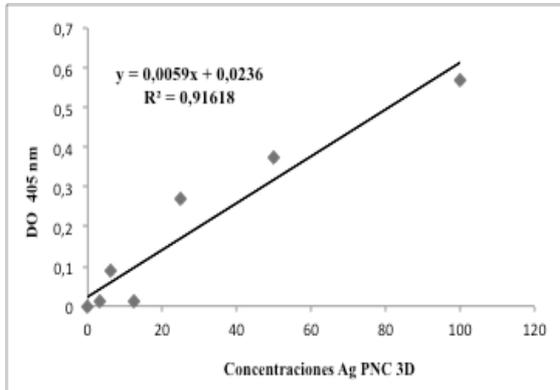


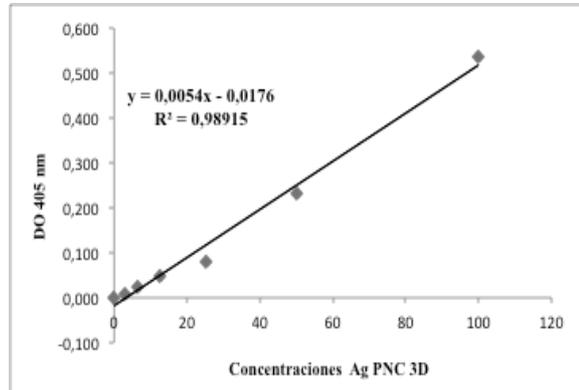
Figura 22. A. Placa de Elisa con las diferentes concentraciones de Ag PNC 3D, donde se aprecia el gradiente de color según su concentración (100- 3,125). B. Diagrama de los valores promedio de las concentraciones obtenidas en cada una de las diluciones.

Para observar la correlación entre las variables densidad óptica (DO) de las absorbancias y las concentraciones del antígeno, se procedió a realizar un análisis de regresión lineal simple. La variable dependiente es la absorbancia y la variable independiente es la concentración. Se realizaron seis réplicas en esta investigación, y no hubo diferencias significativas en el valor de las diferentes replicas por tanto dichos datos se utilizaron para hacer el modelo de regresión (Ver figura 22 de la a-f).

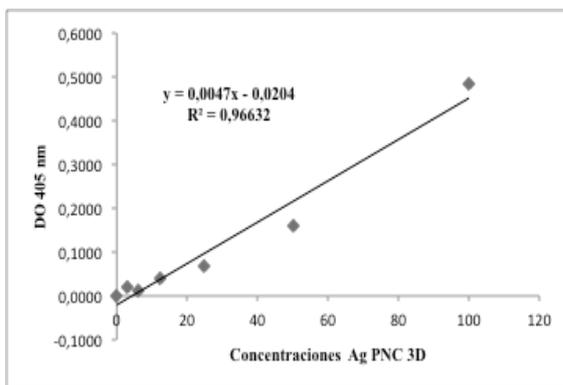
a.



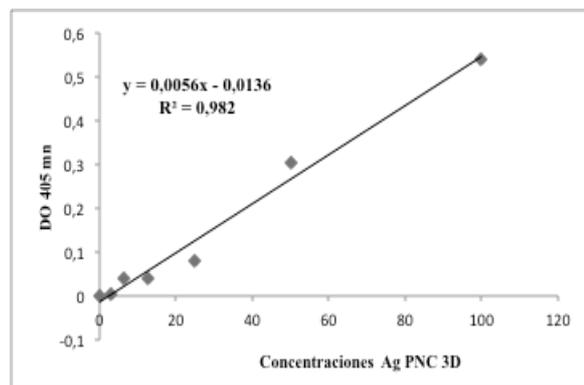
b.



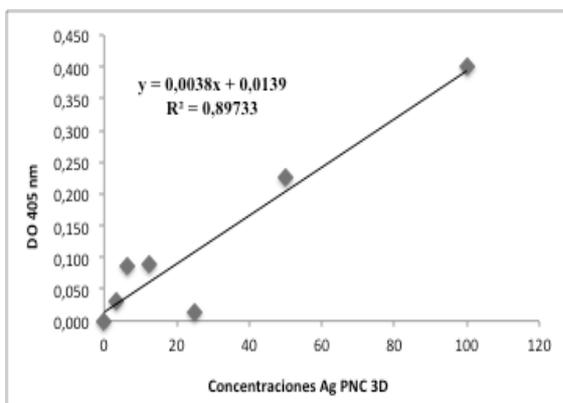
c.



d.



e.



f.

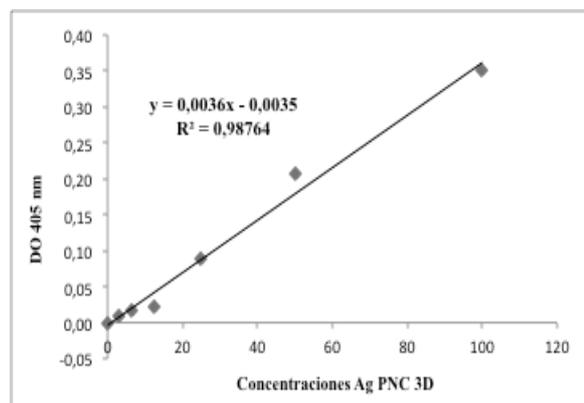


Figura 23. Gráficos de dispersión - Réplicas de los ensayos para la construcción de una curva estándar.

Los comportamientos de la absorbancia vs concentración, indican una relación directamente proporcional entre dichas variables. En las ecuaciones del modelo simple, figura 22, graficas de la a - f, que muestran un coeficiente de determinación (R^2) cercano a 1, indicando que el nivel de concentración hacen variar en casi un 88.8% la absorbancia.

Para presentar los resultados de la regresión lineal simple se presentan las tablas de la 2 a la 5, en el siguiente orden: Estadísticos descriptivos, resumen del modelo de regresión, los resultados de análisis de varianza ANOVA y los coeficientes del modelo. Para correr los datos se utilizó el software estadístico SPSS versión estudiantil 23.0.

Estadísticos Descriptivos.

Tabla 2. Media y desviación estándar de cada una de las concentraciones obtenidas de las diluciones de PNC 3D de cada replica.

Diluciones PNC 3D (Concentraciones)	100	50	25	12,5	6,25	3,125
Replica 1	0,57	0,375	0,27	0,011	0,09	0,01
Replica 2	0,535	0,232	0,08	0,049	0,025	0,01
Replica 3	0,485	0,16	0,07	0,04	0,011	0,02
Replica 4	0,54	0,305	0,08	0,04	0,04	0,003
Replica 5	0,4	0,225	0,014	0,09	0,086	0,03
Replica 6	0,35	0,206	0,09	0,022	0,016	0,01
Media	0,48	0,2505	0,100666667	0,042	0,044666667	0,013833333
D. Estándar	0,087235314	0,076985063	0,087284974	0,027283695	0,035006666	0,009600347

Tomando como referencia las seis réplicas, se obtuvieron los estadísticos descriptivos donde se puede observar que las variaciones son pequeñas luego se puede dar confiabilidad a los datos.

Tabla 3. Resumen del modelo de regresión lineal

Resumen del modelo					
Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado ajustado	Error estándar de la estimación	Durbin-Watson
1	,942 ^a	,888	,885	,059891	1,336
a. Predictores: (Constante), X					
b. Variable dependiente: Y					

En la tabla 3 se observa el coeficiente de correlación R igual a 0.942 indicando una excelente correlación lineal entre la absorbancia y las diferentes concentraciones del antígeno. También se observa que el R² ajustado es igual a 0.885, lo que significa que en un 88.5% la concentración estaría explicando la variación de la absorbancia. El estadístico Durbin-Watson es cercano a 2 por lo tanto no hay problemas de auto correlación (Ver anexo I).

Tabla 4. ANOVA modelo de regresión lineal.

ANOVA ^a						
Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	,970	1	,970	270,301	,000 ^b
	Residuo	,122	34	,004		
	Total	1,091	35			
a. Variable dependiente: Y						
b. Predictores: (Constante), X						

En el análisis de varianza suministrado por el programa se observó un p-valor o sig. Igual a 0.000 que demuestra que la variable concentración es significativa para el modelo y por tanto debe estar en él.

Tabla 5. Coeficientes estandarizados y no estandarizados

Coeficientes ^a						
Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
		B	Error estándar	Beta		
1	(Constante)	-,004	,014		-,277	,783
	X	,005	,000	,942	16,441	,000

a. Variable dependiente: Y

El modelo de regresión lineal simple es $\hat{Y} = \beta_0 + \beta_1 X + \varepsilon_i$; Reemplazando los valores se tiene la siguiente ecuación de regresión estimada $Y = -0.004 + 0.005 X$, sustituyendo los valores y variables se tiene que la ecuación de regresión estimada, esta dada por:

$$\text{Absorbancia} = -0,004 + 0,005 \text{ Concentración} \quad (1)$$

El valor de β_1 es igual -0.004 que es la intercepción entre la línea de mejor ajuste y el eje Y indicando el nivel promedio de la absorbancia cuando el nivel de dilución es 0.

β_2 es igual a 0,005 que corresponde al valor de la pendiente del modelo de regresión simple, indicando que dentro del intervalo muestral de X (Concentración) cuyo rango va entre 3.125 a 100, a medida que este valor aumenta la dilución a 100, la absorbancia aumenta aproximadamente a 0,496. En otras palabras, el incremento estimado en la absorbancia promedio esta por encima de 0,5 densidades ópticas cuando el valor de la dilución es superior a 100.

Tomando como referencia el modelo de la ecuación (1), se despeja la concentración (2), teniendo en cuenta que para esta investigación, uno de los objetivos fue crear un modelo que permita la estimación de las concentraciones, en términos de la absorbancia en las diferentes suspensiones vacunales, donde se obtenga la concentración precisa de la PNC 3D.

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Absorbancia} + 0,004}{0,005} \quad (2)$$

7. Discusión.

En el mercado de productos diagnósticos existe diferentes formatos de pruebas de ELISA indirectos que hasta el momento han servido para detectar la presencia del VFA. El I-ELISA 3ABC (Indirect – Enzyme Linked Immunosorbent Assay) - EITB (Enzyme-Linked Immunoelctrotransfer Blot) es la Prueba Tamiz de Panaftosa, la cual es establecida como prueba de utilización a nivel estatal por parte de los entes de control de sanidad animal de cada país suramericano para detectar la presencia del virus por medio de anticuerpos contra las proteínas no capsidales 3ABC. Este mismo kit es utilizado como soporte para medir la calidad de la vacuna frente a las PNC, puesto que antes de que salga un lote al mercado este es aplicado a una serie de bovinos libres del virus para ver si estos, días después presentan anticuerpos contra estas proteínas ^{3,12, 17}.

Este kit ha tenido muy buenos resultados como método indirecto, pero para los laboratorios productores no es de ayuda como método de control durante el proceso de elaboración vacunal puesto que las trazas pueden en algunas ocasiones alcanzar a inducir anticuerpos contras las PNC, que por lo tanto pueden llegar hacer perder un lote vacunal completo ^{3, 12,13,17}

La presencia de estas trazas de PNC pueden estar influenciadas por la metodología de producción del antígeno, la inclusión de pasos de purificación, la concentración del antígeno,

así como también por la presencia de los adyuvantes ¹⁰⁹. Por lo tanto, en esta investigación se propuso hacer ver esta problemática con las vacunas inactivadas que se trabajan en el país.

El presente trabajo tuvo como objetivo central buscar un método directo que sirva como control de la vacuna anti-aftosa frente a las proteínas no capsidales durante el proceso de producción y producto final. Una prueba inmunoenzimática que logré cuantificar las trazas de PNC, hace falta para darle mayor calidad al proceso de producción y como tal a las formulaciones vacunales.

El desarrollo del objetivo general del proyecto se planteo básicamente en tres etapas, la primera fue investigar el mejor método de purificación para una o varias proteínas no capsidales del VFA, donde se trabajó con el cultivo celular BHK-21 infectado con el virus, el cual durante el proceso es debidamente inactivado; también se utilizo como material biológico el sobrenadante del concentrado con PEG del cultivo, que se obtiene durante el proceso de elaboración de la vacuna, este paso tiene como función separar las cápsides de las proteínas no capsidales, quedando estas últimas en este sobrenadante; esta solución fue monitoreada por electroforesis SDS-PAGE y la única proteína presente e identificada fue la albumina bovina, situación que no debería presentarse, ya que en esta solución deben quedar las PNC, esto es un claro indicativo de la necesidad que existe de implementar una prueba directa que pueda identificar en que solución y en que cantidad quedan estas PNC durante el proceso de elaboración de la vacuna. Este suceso llevó a tener que trabajar únicamente con el cultivo de virus debidamente inactivado, para poder purificar desde allí las PNC.

Dentro del proceso se logró purificar la PNC 3D (Figura 9. Carril 6, 7, 8) convirtiéndose en la proteína de interés. Durante las réplicas se observó que solo se pudo purificar cuando el cultivo se encontraba en un estadio maduro, esto muy posiblemente ocurre porque la

poliproteína está totalmente clivada y las proteínas individualizadas, listas para cumplir sus funciones biológicas. La cromatografía de intercambio iónico fue la técnica que finalmente se ajustó después de intentar con matrices de filtración en gel y otras, donde no se obtuvo buenos resultados (Datos no mostrados). Con la matriz de intercambio catiónico DEAE y el gradiente de tampón salino con tween, se obtuvo la mejor separación, que además permitió solubilizar proteínas hidrófobas. Este procedimiento de purificación fue óptimo, como se demostró en la figura 8 y figura 12, donde se logró aislar en picos diferentes las proteínas del hospedador (Pico I), en otro la albumina bovina (Pico II) y en un tercer pico III la PNC 3D (Figura 9, carril 6, 7, 8 y Figura 13, carril 3). La cual fue debidamente identificada por la técnica de espectrofotometría de masas como se puede ver en la figura 10. Esta proteína en el serotipo VA24C se logró aislar con un alto grado de pureza, como lo corrobora el gel teñido con nitrato de plata con 5 µg de esta proteína, observándose solo una banda con un peso molecular de 51 KDa (Figura 11A), peso molecular que tiene gran similitud con el de otros trabajos donde esta misma proteína es expresada en células de insecto de manera recombinante, con un peso molecular de 53 KDa¹⁰⁷. En el serotipo VO1C la banda de la proteína 3D se identificó pero con menor grado de pureza (Figura 13, carril 3); en este serotipo se identificó esta PNC 3D interaccionando con la PNC VPg. Estas dos proteínas son de gran importancia en la replicación del virus, la proteína PNC 3D es una polimerasa que está asociada directamente con la infección, está presente en un 20-30% en el virus, es una proteína conservada entre los diferentes serotipos y altamente inmunogénica, lo que la convierte en un buen marcador para utilizarla en la producción de anticuerpos policlonales⁸².

La proteína VPg se encuentra asociada con la iniciación de la replicación, cada una de las copias de 3B VPg es capaz de uridilarse *in vitro* por acción de la polimerasa 3D^{51, 52, 53}. La (VPg-3D), es una forma intermedia clave en este proceso de traducción⁵³. Estudios de

modelado *in silico*, demuestran como estas proteínas forman un amplio túnel central capaz de acomodar la doble hélice de RNA durante la fase de elongación ^{49, 50}.

De la proteína 3D no existe reporte de isoformas, en esta ocasión se logró observar tres puntos o spots demostrados en la figura 15, de los cuales faltaría conocer la diferencia de residuos entre ellas, para complementar la información suministrada. En general la purificación de forma nativa de la proteína 3D, es un nuevo método potenciado por su alta pureza y por el suministro ilimitado de material del cual se puede obtener la proteína, lo que baja los costos comparándolo con la purificación de forma recombinante, donde además se han encontrado problemas asociados, como la presencia de anticuerpos contra los antígenos utilizados como vectores de expresión, lo cual puede resultar en significativas reacciones no específicas.

Gracias a la pureza de la proteína se logró pasar a la segunda fase, que consistió en la inducción de anticuerpos policlonales donde primero es importante discutir que el adyudante es fundamental para estimular la producción de anticuerpos, dentro de este proceso, se encontró dificultad con el adyudante montanide, ya que formaba abscesos en los animales inmunizados, interfiriendo en gran parte a la respuesta inmune contra la PNC 3D, limitando la cantidad de anticuerpo específico, motivo por el cual se utilizó el adyudante de freund incompleto mejorando los resultados, donde se corroboró que hubo inmunodetección demostrada en las figuras 20 y 21.

Con la cantidad de anticuerpo purificado se logró hacer la tercer etapa que fue la realización de la curva estándar para uso en un sistema de ELISA, durante este proceso se observó que la concentración de anticuerpo era óptima para el recubrimiento de la placa y su respectiva sensibilización fue de 10 µg/ml, además se logró poner a punto los tiempos y temperaturas de incubación. Después de varias réplicas, se determinó un modelo de Regresión Lineal Simple o

curva estándar de 6 puntos a partir de una concentración de 100 hasta 3,125 nM/pocillo del antígeno 3D, mostrando una linealidad en las distintas réplicas lo que indica que puede ser reproducible. Este modelo estadístico facilitará la estimación de valores de concentración del antígeno (absorbancia) a través de las diferentes diluciones. Se obtuvo un coeficiente de correlación y un coeficiente de determinación. En cuanto al coeficiente de correlación se pudo verificar la existencia de una correlación lineal buena (0.942) entre las concentraciones de dilución y el nivel de absorbancia. El coeficiente de determinación R^2 ajustado, es igual a 0,885 lo que indica que en un 88,5% de la variabilidad de la absorbancia es explicado por la variable dilución del antígeno.

Como se dijo antes, el modelo estadístico presentado, será de gran utilidad, ya que a través de él se pueden hacer estimaciones de la absorbancia con datos reales de la diluciones para cualquier concentración y en una cuarta fase, se recomienda utilizarlo con datos reales que provienen de cada una suspensiones del proceso vacunal.

Existe un trabajo relacionado que utiliza las PNC 3AB₁₀₈, donde la cantidad mínima de antígeno detectable fue de 1,2 ng/pocillo dentro de una curva estándar de 7 puntos a partir de una concentración de 26,6 ng/pocillo hasta 0,41 ng/pocillo del antígeno 3AB. En esta investigación se logró realizar la curva estándar de 6 puntos donde la máxima concentración fue de 100 ng/ml a 3,125, observándose un nivel detectable de proteína en 25 ng/ml, quedando este límite de detección adecuado para nuestros propósitos, si se tiene en cuenta el rango de cuantificación empleado en la curva estándar. En los resultados presentados por trotta en el 2009, sugieren utilizar este método antes de que sea aplicado el adyudante, puesto que los resultados pueden variar, aunque el producto sea sonicado para romper la emulsión, los resultados obtenidos en esa oportunidad fueron negativos a PNC₁₀₈.

Este tipo de ensayos permiten procesar varias muestras por placa y así realizar una evaluación de la pureza de las formulación a lo largo de las etapas de producción, abriéndose la posibilidad de plantear un kit que cuantitativamente determine en cada paso de la producción de la vacuna la existencia real, de la proteína 3D la cual fue en este trabajo la proteína de interés , clave en la reproducción del virus y en este caso ayuda también en la discriminación de animales vacunados de los animales enfermos.

8. Conclusiones.

El método de intercambio catiónico fue el mas óptimo para la purificación de la proteína no capsidal 3D.

Durante el proceso se concluyó que la proteína de interés solo aparece cuando el virus se encontró en un estadio maduro.

Gracias a la pureza del antígeno se pudo obtener las inmunoglobulinas específicas de la proteína no capsidal 3D.

Los anticuerpos específicos con el método suministrado se lograron inmovilizar en una superficie sólida, los ensayos de la curva estándar demostraron tener una tendencia lineal con un coeficiente de determinación dentro de los parámetros aceptados.

Los anticuerpos contra la 3D, se pudieron utilizar en el desarrollo de la curva estándar para usarse en una técnica de Elisa Directo tipo sándwich como método de detección y cuantificación de esta proteína en las diferentes etapas de producción que sirvan de soporte para validar el control de calidad de la vacuna anti aftosa referente al parámetro de pureza a proteínas no capsidales.

9. Recomendaciones.

- Seguir los ensayos a fin de poder estandarizar el método de un Elisa con doble anticuerpo (Monoclonal y policlonal), para garantizar una mejor especificidad, sensibilidad.

- Purificar las PNC ABC para ampliar los marcadores de identificación a fin de tener un kit mas completo que permitan la determinación de estas proteínas en las vacunas comercializadas.

10. Bibliografía

1. Flather, D., Semler BL. (2015). Picornaviruses and nuclear functions: targeting a cellular compartment distinct from the replication site of a positive-strand RNA virus. *Front. Microbiol.* 6: 594. doi: 10.3389/fmicb.2015.00594

2. Cao Y, Lu Z, Liu Z. (2016). Foot-and-mouth disease vaccines: progress and problems, *Expert Review of Vaccines*, 15:6, 783-789, DOI: [10.1586/14760584.2016.1140042](https://doi.org/10.1586/14760584.2016.1140042)

3. World Organization for Animal Health. (OIE). 2018. Manual of for Terrestrial Animals. Chapter 3.1.8. Fiebre aftosa (Infeccion por el virus de la fiebre aftosa).
4. OIE. Organización mundial de sanidad animal (OIE). 2018. Estatus oficial. [http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/estatus-sanitario-oficial/fiebre aftosa/suspensionrestitucion-del-estatus/](http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/estatus-sanitario-oficial/fiebre-aftosa/suspensionrestitucion-del-estatus/)
5. Hosamani, M., Basagoudanavar, S.H., Tamil Selvan, R.P. (2015) A multi-species indirect ELISA for detection of non-structural protein 3ABC specific antibodies to foot-and-mouth disease virus et al. Arch Virol 160: 937. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2339-9>
6. Fukai K, Nishi T, Morioka K, Yamada M, Yoshida K, kitano R, Yamazoe R, kanno T. (2016). Further evaluation of an ELISA kit for detection of antibodies to a nonstructural protein of foot-and-mouth disease virus. J Vet Med Sci. Mar; 78(3): 365–373.
7. Fu Y, Li P, Cao Y, Wang N, Sun P, Shi Q, et al. (2017) Development of a Blocking ELISA Using a Monoclonal Antibody to a Dominant Epitope in Non-Structural Protein 3A of Foot-and-Mouth Disease Virus, as a Matching Test for a Negative-Marker Vaccine. PLoS ONE 12(1): e0170560. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170560>
8. Bergmann I E, Malirat V, Neitzert E, Beck E, Panizzutti N, Sanchez C , Falczuk A. (2000). “Improvement of a serodiagnostic strategy for foot and mouth disease virus surveillance in cattle under systematic vaccination: a combined system of an indirect ELISA 3ABC with an

enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay”, *Arch. Virol.*, 145, 473-489.

9. Gelkop, S., Sobarzo, A., Brangel, P., Vincke, C., Romão, E., Fedida-Metula, S., Lobel, L. (2018). The Development and Validation of a Novel Nanobody-Based Competitive ELISA for the Detection of Foot and Mouth Disease 3ABC Antibodies in Cattle. *Frontiers in veterinary science*, 5, 250. doi:10.3389/fvets.2018.00250

10. Chung, C. J., Clavijo, A., Bounpheng, M. A., Uddowla, S., Sayed, A., Dancho, B. (2018). An improved, rapid competitive ELISA using a novel conserved 3B epitope for the detection of serum antibodies to foot-and-mouth disease virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 30 (5), 699–707. <https://doi.org/10.1177/1040638718779641>

11. V. Malirat, E. Neitzert, I. E. Bergmann, E. Maradei, and E. Beck (1998). “Detection of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus by means of an indirect ELISA test using bioengineered nonstructural polyprotein 3ABC”, *Vet. Q.*, 20 Suppl 2, S24-S26.

12. World Organisation for animal health (OIE). (2018). Principles of validation of diagnostic assays for infectious diseases. In: *OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines*, Third Edition. OIE, Paris, France, 8–15.

13. ICA. Instituto Colombiano Agropecuario. (2008). Resolución No. 02319 [7 de Julio de 2008] URL: <http://www.ica.gov.co/>

14. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (2015). – Código Sanitario para los Animales Terrestres, Capítulo 8.8. Fiebre aftosa. OIE, París, Francia. Página web:

15. Knight TJD, Rushtonb J. (2013) The economic impacts of foot and mouth disease – What are they, how big are they and where do they occur? Preventive Veterinary Medicine. Volume 112, Issues 3–4, Pages 161-173
16. Federación Colombiana de Ganaderos- Fedegan. (2017). [Diapositivas de PowerPoint], de www.fedegan.org.co
17. Centro panamericano de fiebre aftosa – OPS. El Plan Hemisférico de Erradicación de la Fiebre Aftosa PHEFA, 2011 - 2020. https://www.paho.org/panaftosa/index.php?option=com_content&view=article&id=55:programa-hemisferico-de-erradicacion-de-la-fiebre-aftosa&Itemid=281
18. Domingo, E., Escarmis,C., Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C.M., Carrillo, E., Nunez, J.I. and Sobrino, F. (2003). Evolution of foot and mouth disease virus. *Virus Res.*, 91, 47-63.
19. Knowles, N.J., Samuel, A.R. (2003). Molecular epidemiology of footand- mouth disease virus. *Virus* 91, 65- 80.
20. Jackson, T., Stuart, D.I., Fry, E. (2003). Structure and receptor binding. *Virus* 91, 33- 46.
21. Robertson, B.H., Grubman, M.J., Weddell, G.N., Moore, D.M., Welsh, J.D., Fischer, T., Dowbenko, D.J., Yansura, D.G., Small, B., Kleid, D.G., (1985). Nucleotide and amino acid sequence coding for polypeptides of foot-and-mouth disease virus type A12. *J. Virol.* 54,

651_ 660.

22. Witwer, C., S. Rauscher, I. L. Hofacker & P. F. Stadler. (2001) Conserved RNA secondary structures in Picornaviridae genomes. *Nucleic Acids Res*, 29, 5079-89.
23. Mason, P.W., Grubman, M.J. and Baxt, B. (2003). Molecular basis of pathogenesis of FMDV. *Virus Res.*, 91, 9-32.
24. Escarmis, C., J. Dopazo, M. Davila, E. L. Palma & E. Domingo (1995) Large deletions in the 5'-untranslated region of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *Virus Res*, 35, 155-67.
25. Nayak A, Goodfellow IG, Woolaway KE, et al. (2006). Role of RNA structure and RNA binding activity of foot-and-mouth disease virus 3C protein in VPg uridylylation and virus replication. *J Virol.*; 80: 9865-75.
26. Paul, A. V., Peters, J., Mugavero, J., Yin, J., van Boom, J. H., and Wimmer, E. (2003). Biochemical and genetic studies of the VPg uridylylation reaction catalyzed by the RNA polymerase of poliovirus. *J Virol* 77(2), 891-904.
27. Tiley, L., King, A. M., and Belsham, G. J. (2003). The foot-and-mouth disease virus cis-acting replication element (*cre*) can be complemented in trans within infected cells. *J Virol* 77(3), 2243-6.
28. Wimmer, E., Hellen, C. U., and Cao, X. (1993). Genetics of poliovirus. *Annu Rev Genet*

27, 353-436.

29. Martínez-Salas, E., Quinto, S. L., Ramos, R., and Fernandez-Miragall, O. (2002). IRES elements: features of the RNA structure contributing to their activity. *Biochimie* 84(8), 755-63.

30. Belsham, G. J., and Sonenberg, N. (2000). Picornavirus RNA translation: roles for cellular proteins. *Trends Microbiol* 8(7), 330-5.

31. Kuhn, R. J., Luz, N., and Beck, E. (1990). Functional analysis of the internal translation initiation site of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 64, 4625-4631.

32. Forss, S., Strebel, K., Beck, E., Schaller, H. (1984). Nucleotide sequence and genome organization of foot and mouth disease virus. *Nucleic Acids Res.* 12, 6587-6601.

33. Palmenberg, A. C. (1990) Proteolytic processing of picornaviral polyprotein. *Annu Rev Microbiol*, 44, 603-23.

34. Belsham, G.J (1993). Distinctive features of foot-and-mouth disease virus, a member of the picornavirus family; aspects of virus protein synthesis, protein processing and structure. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 60(3):241-260.

35. Forss, S., K. Strebel, E. Beck & H. Schaller (1984) Nucleotide sequence and genome organization of foot-and-mouth disease virus. *Nucleic Acids Res*, 12, 6587-601.

36. Malik N, Kotecha A, Gold S, et al. (2017). Structures of foot and mouth disease virus

pentamers: Insight into capsid dissociation and unexpected pentamer reassociation. PLoS pathogens.; 13(9), e1006607. doi:10.1371/journal.ppat.1006607

37. F. Sobrino, and E. Domingo (2004) “Foot-and-mouth disease: Current Perspectives, Horizon Bioscience”, Wymondham, England,

38. Curry, S., E. Fry, W. Blakemore, R. Abu-Ghazaleh, T. Jackson, A. King, S. Lea, J. Newman & D. Stuart (1997). Dissecting the roles of VP0 cleavage and RNA packaging in picornavirus capsid stabilization: the structure of empty capsids of foot-and-mouth disease virus. J Virol, 71, 9743-52.

39. Gao Y, Sun S, and Guo HC. (2016). Biological function of Foot-and-mouth disease virus non-structural proteins and non-coding elements. Virology journal; 13, 107. doi:10.1186/s12985-016-0561-z

40. de Felipe, P., Hughes, L. E., Ryan, M. D. y Brown, J. D. (2003). Co-translational, intraribosomal cleavage of polypeptides by the foot-and-mouth disease virus 2A peptide. The Journal of biological chemistry 278, 11441-11448.

41. Teterina NL, Gorbalenya AE, Egger D, et al. (2006). Testing the modularity of the N-terminal amphipathic helix conserved in picornavirus 2C proteins and hepatitis C NS5A protein. Virology; 344: 453-67.

42. Gromeier M., Bossert B., Arita M., Nomoto A., Wimmer E. (1999). Dual stem loops within the poliovirus internal ribosomal entry site control neurovirulence J Virol 73 958–964 .

43. Xiang, W., A. Cuconati, D. Hope, K. Kirkegaard & E. Wimmer (1998) Complete protein linkage map of poliovirus P3 proteins: interaction of polymerase 3Dpol with VPg and with genetic variants of 3AB. *J Virol*, 72, 6732-41.
44. Doedens, J. R. & K. Kirkegaard (1995) Inhibition of cellular protein secretion by poliovirus proteins 2B and 3A. *EMBO J*, 14, 894-907.
45. Chatterjee, N. K., H. L. Bachrach & J. Polatnick (1976) Foot-and-mouth disease virus RNA. Presence of 3'-terminal polyriboadenylic acid and absence of amino acid binding ability. *Virology*, 69, 369-77.
46. Sangar, D. V., D. N. Black, D. J. Rowlands & F. Brown (1977) Biochemical mapping of the foot-and-mouth disease virus genome. *J Gen Virol*, 35, 281-97.
47. Saiz, M., S. Gomez, E. Martinez-Salas & F. Sobrino (2001) Deletion or substitution of the aphthovirus 3' NCR abrogates infectivity and virus replication. *J Gen Virol*, 82, 93-101.
48. Barton, D. J., B. J. O'Donnell & J. B. Flanagan (2001) 5' cloverleaf in poliovirus RNA is a cis-acting replication element required for negative-strand synthesis. *EMBO J*, 20, 1439-48.
49. Herold, J. & R. Andino (2001) Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Mol Cell*, 7, 581-91.

50. Ferrer-Orta, C., D. Ferrero & N. Verdaguer (2015) RNA-Dependent RNA Polymerases of Picornaviruses: From the Structure to Regulatory Mechanisms. *Viruses*, 7, 4438-60.
51. Ferrer-Orta, C., A. Arias, C. Escarmis & N. Verdaguer (2006b) A comparison of viral RNA-dependent RNA polymerases. *Curr Opin Struct Biol*, 16, 27-34.
52. Ferrer-Orta, C., A. Arias, R. Agudo, R. Perez-Luque, C. Escarmis, E. Domingo & N. Verdaguer (2006a) The structure of a protein primer-polymerase complex in the initiation of genome replication. *EMBO J*, 25, 880-8.
53. Nayak, A., I. G. Goodfellow & G. J. Belsham (2005) Factors required for the Uridylylation of the foot-and-mouth disease virus 3B1, 3B2, and 3B3 peptides by the RNA-dependent RNA polymerase (3Dpol) in vitro. *J Virol*, 79, 7698-706.
54. Ferrer-Orta, C., A. Arias, R. Perez-Luque, C. Escarmis, E. Domingo & N. Verdaguer (2004) Structure of foot-and-mouth disease virus RNA-dependent RNA polymerase and its complex with a template-primer RNA. *J Biol Chem*, 279, 47212-21.
55. Ferrer-Orta, C., Agudo, R., Domingo, E. & Verdaguer, N. (2009). Structural insights into replication initiation and elongation processes by the FMDV RNA-dependent RNA polymerase. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 19, 752–758.
56. Arlingi-Iaus, R. B. & Polatnick, J. (1969a). In vitro products of a membrane-free foot-and-mouth disease virus ribonucleic acid polymerase. *Virology* 37, z5z.

57. Ruoslahti, E. & Pierschbacher, M. D. (1987). New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 238, 491497.
58. Ren, R., F. C. Costantini, E. J. Gorgacz, J. J. Lee, and V. R. Racaniello. (1990). Transgenic mice expressing a human poliovirus receptor: a new model for poliomyelitis. *Cell* 63:353-362.
59. Racaniello, V.R. (2001). Picornaviridae: The Virus and Their Replication, In: Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B., Straus, S.E. (Eds.) *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins., Philadelphia, PA, USA.
60. Forman, A.J. and Gibbs, E.P.J. (1974). Studies with foot-and-mouth disease virus in british deer (red, fallow and roe). I. Clinical disease. *Journal of Comparative Pathology* 84: 215-220.
61. Loeffler, F. Y Frosch, P. (1964). Report of the Commission for Research on foot-and-mouth disease. En *Selected papers on virology*. Pág. 64-68. Editado por N. Hahon: Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall.
62. Arzt J, Baxt B, Grubman MJ, Jackson T, Juleff N, Rhyan J, Rieder E, Waters R, Rodriguez LL. (2011). The pathogenesis of foot-and-mouth disease II: viral pathways in swine, small ruminants, and wildlife; myotropism, chronic syndromes, and molecular virus-host interactions. *Transbound Emerg Dis*;58(4):305-26.

63. Kitching RP. (2005). Global epidemiology and prospects for control of foot-and-mouth disease. *Curr Top Microbiol Immunol.*;288:133-48.
64. Shahan, M.S. (1962). The virus of foot-and-mouth disease. *Ann N Y Acad Sci* 101, 444-454.
65. Burrows, R. (1968). The persistence of foot-and mouth disease virus in sheep. *J Hyg (Lond)* 66, 633-640.
66. Sellers, R.F. (1971), Quantitative aspects of the spread of foot-and-mouth disease. *Vet. Bull.* 41, 431.
67. Cottral, G.E., Cox, B.F., Baldwin, D.E., (1960). The survival of foot-and-mouth disease virus in cured and uncured meat. *Am J Vet Res* 21, 288-297.
68. Abubakar M, Manzoor S, Ahmed A. (2018). Interplay of foot and mouth disease virus with cell-mediated and humoral immunity of host. *Rev Med Virol*;28(2):e1966.
69. Suttmoller, P., McVicar, J.W., Cottral, G.E (1968). The epizootiological importance of foot-and-mouth disease carriers. I. Experimentally produced foot-and-mouth disease carriers in susceptible and immune cattle. *Arch Gesamte Virusforsch* 23, 227-235.
70. Van Bekkum, J.G. (1969). Correlation between serum antibody level and protection against challenge with FMDV. (Rome), pp. 38-41.

71. Gebauer, F., de la Torre, J.C., Gomes, I., Mateu, M.G., Barahona, H., Tiraboschi, B., Bergmann, I., de Mello, P.A., Domingo, E. (1988). Rapid selection of genetic and antigenic variants of foot-and-mouth disease virus during persistence in cattle. *J Virol* 62, 2041-2049.
72. Reid, S.M., Ferris, N.P., Hutchings, G.H., Samuel, A.R. and Knowles, N.J. (2000). Primary diagnosis of foot-and-mouth disease by reverse transcription polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*, 89, 167-176.
73. Alexandersen, S., Zhang, Z., Donaldson, A.I. and Garland, A.J. (2003). The pathogenesis and diagnosis of foot-and-mouth disease. *J. Comp Pathol.*, 129, 1-36.
74. Woodbury E.L. (1995). A review of the possible mechanisms for the persistence of foot-and-mouth disease virus. *Epidemiol. Infect.*, 114, 1-13.
75. Hamblin, C., Barnett, I.T. and Crowther, J.R. (1986a). A new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus. II. Application. *J. Immunol. Methods*, 93, 123-129.
76. Hamblin, C., Barnett, I.T. and Hedger, R.S. (1986b). A new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus. I. Development and method of ELISA. *J. Immunol. Methods*, 93, 115-121.
77. Robiolo, B., Griega, P.R., Periolo, O., Seki, C., Bianchi, T., Maradei, E., La Torre, J. (1995). Assessment of foot and mouth disease vaccine potency by liquid phase blockig ELISA: a proposal for an alternative to the challenge procedure in Argentina. *Vaccine*, Vol. 13. N°14. pp 1346-1352.

78. Alonso-Fernandez A, Sondahl MS, Giacometti H, Ferreira MEV (1984). Identificación de anticuerpos VIA de la fiebre aftosa. Serie de Manuales Técnicos N°6. Cent Panam de Fiebre Aftosa. Rio de Janeiro. OPS/OMS.
79. Alonso-Fernandez A, Gomes MPD, Martins MA, Sondahl MS (1990). Detection of foot-and-mouth disease virus infection-associated antigen antibodies: comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay and agar gel immunodifusion tests. *Prev Vet Med* 9, 233-240.
80. Mackay DKJ, Madekurozwa RL. (1992). Assessment of the VIAA ELISA for FMD. Report for the Community Reference Laboratory for FMD. Pirbright: Institute for Animal Health.
81. Neitzert E, Beck E, Augé de Mello P, Gomes I, Bergmann IE. (1991). Expression of the aphthovirus RNA polymerase gene in *E. coli* and its use together with other bioengineered non-structural antigens in detection of late persistent infections. *Virology*;184:799-804.
82. Bergmann IE.1 , Malirat V, Falczuk A2 , Sondahl MS. (2001). Uso de una proteína recombinante del virus de la fiebre aftosa, la polimerasa 3D, en una prueba de inmunodifusión en gel de agar. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 64-67: 30-34.
83. Silberstein,E., Kaplan,G., Taboga,O., Duffy,S. and Palma,E. (1997). Foot-and-mouth disease virus infected but not vaccinated cattle develop antibodies against recombinant 3AB1 nonstructural protein. *Arch. Virol.*, 142, 795-805.

84. Sorensen,K.J., Madsen,K.G., Madsen,E.S., Salt,J.S., Nqindi, J. and Mackay, D.K. (1998). Differentiation of infection from vaccination in foot-and-mouth disease by the detection of antibodies to the non-structural proteins 3D, 3AB and 3ABC in ELISA using antigens expressed in baculovirus. *Arch. Virol.*, 143, 1461-1476.
85. Mackay,D.K., Forsyth,M.A., Davies,P.R., Berlinzani,A., Belsham,G.J., Flint, M. and Ryan,M.D. (1998). Differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease using a panel of recombinant, non-structural proteins in ELISA. *Vaccine*, 16, 446-459.
86. Bergmann IE, Malirat V, Neitzert E, Beck E, Panizzutti N, Sánchez C, Falczuk A. (2000). Improvement of a serodiagnostic strategy for foot-and-mouth disease virus surveillance in cattle under systematic vaccination: a combined system of an indirect ELISA-3ABC with an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay. *Arch Virol.*145(3):473-89.
87. Bahnemann HG (1975). Binary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production. *Arch. Virol.*47: 47-56.
88. Organización mundial de sanidad animal (OIE). 2018. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres. Capítulo 1.1.8. Principios de producción de vacunas veterinarias.
89. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, et al (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry.*; Pages 76-8.

90. Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 227 (5259): 680–685.
91. O'Farrell PH. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.*; 250: 4007-21. PMC 2874754.
92. Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68, 850-858
93. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem.*; 68:850-858.
94. Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis.*; 20:3551-3367.
95. Jorge I, Casas EM, Villar M, et al. (2007). High-sensitivity analysis of specific peptides in complex samples by selected MS/MS ion monitoring and linear ion trap mass spectrometry: application to biological studies. *Journal of Mass Spectrometry.* 42(11): 1391-403
96. Warr GW (1982). Preparation of antigens and principles of immunization. In: *Antibody as a Tool*. John Wiley, New York. pp. 21-58.
97. Grodzki AC, Berenstein E. (2010). Antibody purification: ammonium sulfate fractionation or gel filtration. In: C. Oliver and M.C. Jamur (eds), *Immunocytochemical Methods and*

Protocols, Methods Mol Biol. 588:15-26. doi: 10.1007/978-1-59745-32403.

98. Cuatrecasas P. (1970). Protein purification by affinity chromatography: derivatizations of agarose and polyacrylamide beads. *J. Biol. Chem.* 245:3059-65.

99. Catty D, Raykundalia C. (1988) Production and quality control of polyclonal antibodies. In: Catty, D eds *Antibodies. Vol. I. A Practical Approach.* IRL Press, Oxford, pp. 19- 80.

100. Kirschenbaum DM. (1976) in “*Handbook of biochemistry and molecular biology*” (G. D. Fasman, ed.). CRC Press, Cleveland, Ohio. 3rd Ed., Vol. 2, p.383.

101. Harlow E, Lane D. (1996). *Antibodies: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. Gagnon, P.

102. Ouchterlony O, Nilsson LA (1978). Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In: Weir, D.M. (Edit.) *Handbook of immunological methods, Vol. 1: Immunochemistry.* Blackwell Scientific Publications, Oxford,; 1 9:1.

103. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,; 76 (9), 4350–4354.

104. Guesdon JL, Avrameas S. (1981a). Solid phase enzyme immunoassays. *Appl Biochem Bioeng* 2: 207-232.

105. Guesdon JL, Avrameas S. (1981b). Magnetic solid-phase enzyme immunoassay for the quantitation of antigens and antibodies: application to human immunoglobulin E. *Meth Enzymol* 73: 471-482.
106. Engvall E, Perlman P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*. 8:871-4.
107. Kumar R, Hosamani M, Sreenivasa BP, et al. (2012) Expression of Foot-and-Mouth Disease Virus Non-Structural Protein, 3D in Insect Cells and its Application in Detection of Anti-FMDV Antibodies. *Indian journal of virology : an official organ of Indian Virological Society*.;23(3):326-332. doi:10.1007/s13337-012-0098-8.
108. Trotta MV. (2009). Desarrollo y evaluación de tecnología para la detección de proteínas no estructurales del Virus de la Fiebre Aftosa en formulaciones vacunales. Instituto de Virología, Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
109. Mondragón N, Vera V, Restrepo G. (2006). Evaluación de dos formulaciones de vacuna antiaftosa oleosa bivalente (O1 campos y A24 cruzeiro), preparadas con dos sistemas diferentes de purificación y concentración. *Rev Col Cienc Pec* Vol. 19:4.

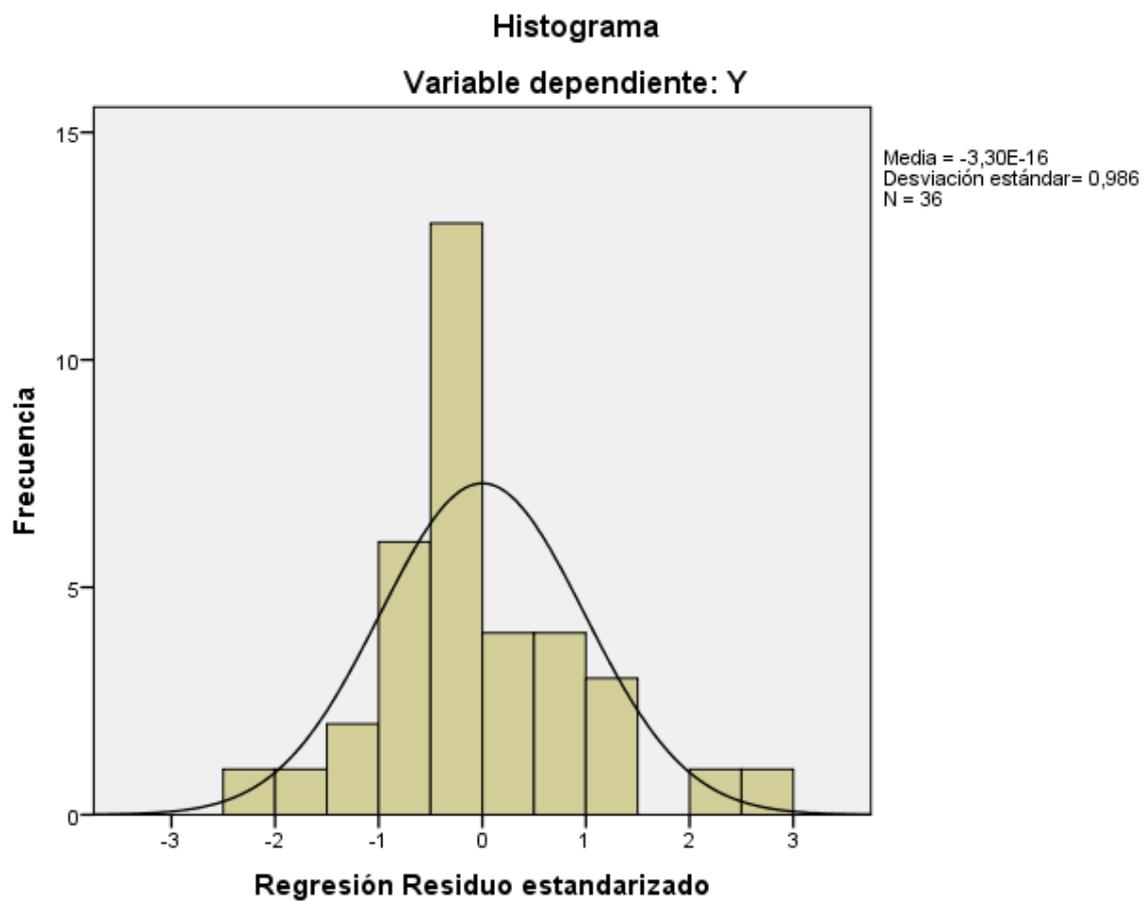
11. Apendices.

Tabla A. Estadísticas de Residuos.

Estadísticas de residuos ^a					
	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar	N
Valor pronosticado	,01130	,48112	,15528	,166436	36
Residuo	-,131124	,152611	,000000	,059029	36
Valor pronosticado estándar	-,865	1,958	,000	1,000	36
Residuo estándar	-2,189	2,548	,000	,986	36

a. Variable dependiente: Y

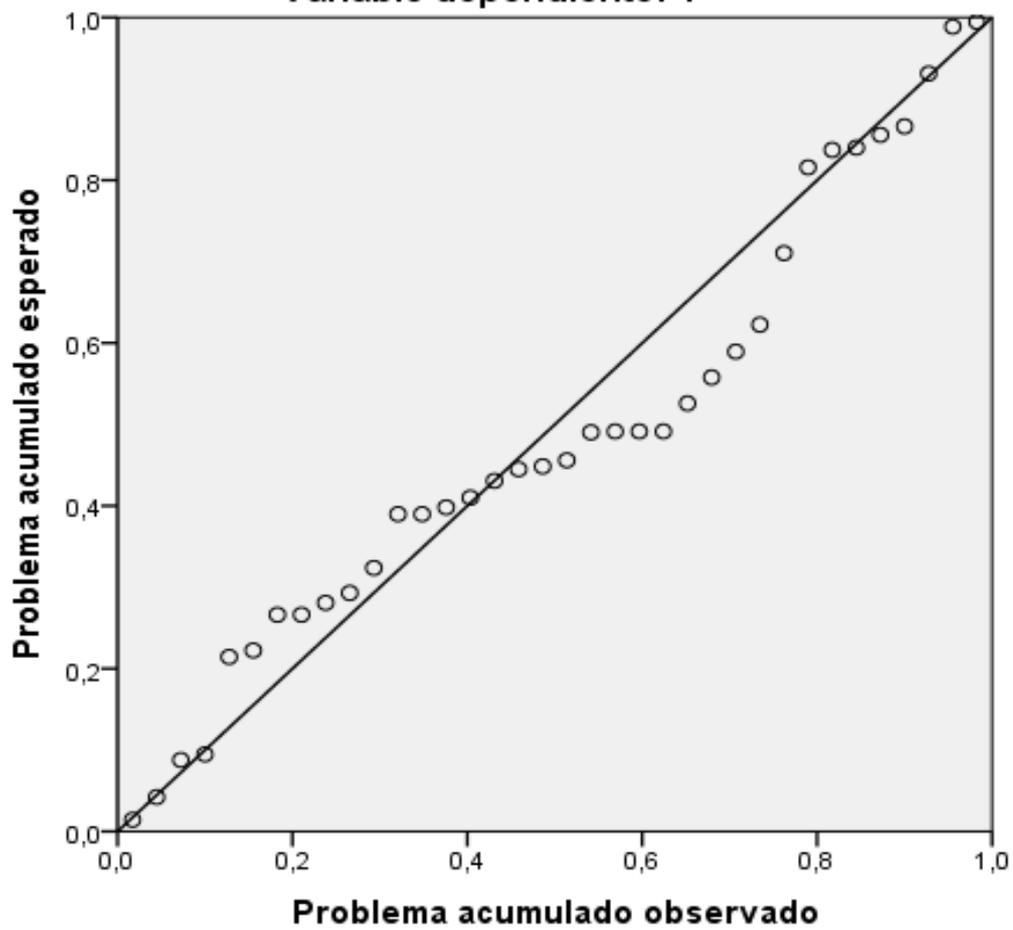
B. Gráficos de normalidad. Modelo de regresión (1)



C.

Gráfico P-P normal de regresión Residuo estandarizado

Variable dependiente: Y



D.

