



Universidad Autónoma De Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales



Evaluación de la inmunogenicidad de péptidos sintéticos de la proteína VP60 del virus causante de la enfermedad hemorrágica de los conejos.

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Médico Veterinario Zootecnista

Presenta

Sergio Hugo Nieve Morán

Dirigido por:

Juan Joel Mosqueda Gualito

Querétaro, Qro. a Octubre 2023



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Evaluación de la inmunogenicidad de péptidos
sintéticos de la proteína VP60 del virus causante de la
enfermedad hemorrágica de los conejos.

por

Sergio Hugo Nieves Moran

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0
Internacional](#).

Clave RI: CNLIC-267595



Universidad Autónoma De Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales



Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia

Evaluación de la inmunogenicidad de péptidos sintéticos de la proteína VP60 del virus causante de la enfermedad hemorrágica de los conejos.

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Licenciado en Médico Veterinario y Zootecnista

Presenta

Sergio Hugo Nieve Morán

Dirigido por:

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

SINODALES

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Presidente

Dr. José Guadalupe Gómez Soto

Secretario

Dr. Diego Josimar Hernández Silva

Vocal

Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez

Vocal

Dra. Alma Cárdenas Flores

Vocal

Centro Universitario,

Querétaro, Qro,

Mexico

Dedicatorias

A mis padres, Mónica Morán Rodríguez y Margarito Nieves Hernández por su apoyo, que a pesar de las diferencias que hemos tenido me apoyaron durante estos casi 5 años.

A mis abuelos, que ya no están, pero me dieron grandes lecciones de vida y a la única que aún me acompaña mi abuela Carme.

A mis hermanos, Yesika y Jesús, que a pesar de las diferencias que solemos tener siempre están para apoyarme y yo a ellos de forma incondicional.

A toda mi familia que siempre está presente y atentos a los logros de cada individuo que forma parte de este hermoso círculo familiar.

A mis amigos y amigas que durante toda la carrera estuvimos juntos y nos apoyamos en todo momento, Marianita, Luz (la Foco), Carlos (Charly), Daniel, Ana, Majo (Meriyen), Nancy, Nacho, Roberto, Alejandra, Lore, Judith y todos aquellos con los que la vida me permitió coincidir en esta etapa de mi vida.

A mis amigos del alma, Juanita mi amiga y hermana de choco aventuras, a Cesy y a Kevin que a pesar de la distancia y el éxito que han tenido aún estamos al tanto yo de ellos como ellos de mí.

A todos mis profesores, que gracias a su gran dedicación, paciencia, regaños y confianza durante estos años lograron motivarme e inspirarme para culminar esta etapa de mi vida.

Agradecimientos

A Fondo de Proyectos Especiales de Rectoría (FOPER) por el apoyo para el financiamiento de la presente tesis a través del FOPER-2022-FCN02974.

A la Coordinación de la Lic. en Medicina Veterinaria y Zootecnia por su apoyo.

A mis sinodales, por su invaluable apoyo en la realización de este proyecto, en especial al Doc. Juan Mosqueda, la Dra. Alma Cárdena y al Doc Diego Josimar Hernández quienes me dieron todo su apoyo durante mi estancia en el laboratorio LINVAS

A todos los miembros del laboratorio de Inmunología y Vacunas (LINVAS)

De manera especial a mis compañeros de laboratorio: Mariana, Edwin, Valeria, América, Chyntia, Alejandra, Emmanuel, Aldo, Andrés, Mayra, Juan Carlos, Iván, Rolando, Ana, Irvin y Gerardo por su invaluable ayuda durante la realización de los experimentos.

Índice de Contenidos

Dedicatorias.....	3
Agradecimientos.....	4
Índice de Contenidos.....	5
Índice de Cuadros.....	6
Índice de Figuras.....	7
Resumen.....	9
Summary.....	10
I. Introducción.....	11
II. Antecedentes.....	12
2.1 Enfermedad Hemorrágica Viral del Conejo (EVHC).....	12
2.2 Patogenia.....	13
2.3 Signos clínicos y lesiones.....	15
2.4 Epidemiología.....	17
2.5 Mecanismos de trasmisión.....	18
2.5.1 Carnívoros.....	19
2.5.2 Moscas.....	19
2.5.3 Pulgas.....	19
2.6 Situación en México.....	19
2.7 Vacunas.....	26
2.8 Vacunas recombinantes.....	26
2.9 Adyuvantes.....	27
2.10 Vacunas a nivel mundial contra VEHC.....	27
2.11 Vacunas en México contra VEHC.....	28
2.12 Prueba de ELISA como diagnóstico.....	28
III. Hipótesis.....	28
IV. Objetivos.....	29
4.1 Objetivo General.....	29
4.2 Objetivos Específicos.....	29

V.	Material y Método.....	29
5.1	Materiales para la Elaboración de Vacunas:	29
5.2	Materiales para la Inmunización y el Muestreo de los conejos:.....	29
5.3	Materiales para la elaboración de las ELISAs.....	30
5.4	Método para la Elaboración de las Vacunas:	30
5.5	Método para la Inmunización y el muestreo de los conejos:	35
5.6	Método para Elaboración de ELISAs	38
5.6.1	Titulación de los Péptidos:.....	38
5.6.2	Titulación de anticuerpo primario:.....	42
5.6.2	Evaluación de la inmunogenicidad contra cada péptido:	43
VI	Resultados y Discusión	46
6.1	Resultados de la determinación de la dilución del Anti-Conejo IgG H + L HRP 46	
6.2	Resultados de la Titulación de cada Péptido.	47
6.3	Resultados de la Titulación del anticuerpo primario contra cada Péptidos 49	
6.4	Resultados de la evaluación de la inmunogenicidad Contra cada Péptido y la proteína quimérica.	52
6.5	Resultados de las pruebas extras realizadas al péptido 3.....	58
VII	Conclusiones.....	59
VIII	Bibliografía	60
IX	Anexos	63

Índice de Cuadros

Cuadro 1	Lesiones macroscópicas y microscópicas observadas en animales en enfermedad hemorrágica del conejo.....	14
Cuadro 2	Pesaje de los péptidos para la concentración de 2mg\ml.....	31
Cuadro 3	Operaciones para calcular el PBS necesario para la concentración requerida	31
Cuadro 4	Conejos por grupos y volúmenes por inmunización	32
Cuadro 5	Cantidades de Péptido, PBS y montanide por vacuna	33
Cuadro 6	Fechas de muestreos e inmunizaciones	36
Cuadro 7	Datos de las concentraciones de cada péptido	44
Cuadro 8	Datos de las concentraciones de la proteína para cada péptido.....	44

Índice de Figuras

Figura 1 Imagen microscópica del hígado.	15
Figura 2 Bazo con esplenomegalia obtenido de Marques et al., 2010	16
Figura 3 Hemorragia y congestión en pulmón obtenido de Marques et al., 2010. .	16
Figura 4 Descarga nasal sanguinolenta o epistaxis obtenido de Rosell et al., 2029.	17
Figura 5 Mapa 1, Estatus mundial en 2019 y focos de la EVHC del 2015 a Junio del 2020 obtenido de OIE et al., 2019.....	18
Figura 6 Mapa 2, Estados afectados por el evento epidemiológico de EHVC en México (1988-1991) obtenido de SINASA et al., 1989.....	20
Figura 7 Mapa 3, Biodiversidad del Orden Lagomorpha avistados en México obtenido de SENASICA et al., 2020	21
Figura 8 Grafica 1, Unidades de producción cunícola registradas en SINIIGA e inventario nacional obtenido de SINIIGA et al., 2020.....	22
Figura 9 Mapa 4, Densidad de unidades de producción cunícola obtenido de SENASICA et al., 2020.....	22
Figura 10 Mapa 5. Ubicación del foco índice de EHVC en Nuevo Casa Grande, Chihuahua. obtenido de SENASICA et al., 2020.....	23
Figura 11 Mapa 6, Investigaciones positivas de EVHC por sema y municipio obtenido de SENASICA et al., 2020.....	24
Figura 12 Grafica 2, Inventario Histórico de conejos y liebres de México (Millones de cabezas) obtenido de SINIIGA et al 2020.....	25
Figura 13 Grafica 3, Producción nacional histórico de carne de conejo obtenido de SINIIGA et al., 2020.....	25
Figura 14 Grafica 4, Composición del inventario nacional de conejos 2020 (cabezas) obtenido de SINIIGA et al., 2020.....	26
Figura 15 Sonicación de los Péptidos.....	32
Figura 16 Material dentro de cabina de bioseguridad estéril.....	34
Figura 17 Colocación del homogenizado en Benzal	34
Figura 18 Proceso de elaboración de las vacunas. Fotografía tomada por S. Nieves 2022.....	34
Figura 19 Micelas observadas al microscopio.....	35
Figura 21 Contención con trazo.....	36
Figura 20 Cajón de contención	36
Figura 22 Toma de muestra de arteria auricular	37
Figura 23 Distribución del péptido 2 y 4 para realizar las diluciones seriadas	39
Figura 24 Distribución de anticuerpo primario de los péptidos 2 y 4	41
Figura 25 Sensibilizado de la placa para el péptido 1	42
Figura 26 Distribución y dilución seriada para titulación de anticuerpo primario péptido 1.....	43

Figura 27 distribución de la placa sensibilizada con la proteína VP60 y colocación	45
Figura 28 Distribución de la placa sensibilizada con de los péptidos 1,2, 3 y.....	45
Figura 29 Titulación del anticuerpo anti-conejo IgG H+L HRP.	46
Figura 30 Titulación de la concentración de los péptidos 1, 2 y 3.	47
Figura 31 Titulación de la concentración de los péptidos 4, 5 y 6	48
Figura 32 Titulación de la dilución del Ac primario contra el péptidos 1, 2 y 3.....	49
Figura 33 Titulación de la dilución del Ac primario contra el péptidos 4, 5 y 6.....	51
Figura 34 Evaluación de la Inmunogenicidad contra el péptido 1.....	52
Figura 35 Evaluación de la Inmunogenicidad contra el péptido 2.....	53
Figura 36 Evaluación de la Inmunogenicidad contra el péptido 3.....	54
Figura 37 Evaluación de la Inmunogenicidad contra el péptido 4.....	55
Figura 38 Evaluación de la Inmunogenicidad contra el péptido 5.....	56
Figura 39 Evaluación de la Inmunogenicidad contra el péptido 6.....	57
Figura 40 Titulación de la concentración del péptido 3 contra Ac de la proteína quimérica.....	58
Figura 41 Titulación del Ac de la proteína recombinante contra el péptido 3.	59

Resumen

La Enfermedad Hemorrágica Viral del Conejo (EHVC), también llamada septicemia vírica o peste china, es una enfermedad altamente contagiosa, en la mayoría de los casos fatal. En abril del año 2020 se dio en México un rebrote de esta enfermedad considerada erradicada, poniendo en peligro la cunicultura y el equilibrio de los ecosistemas del país, pues México cuenta con varias especies endémicas de lagomorfos. En el Laboratorio de Inmunología y Vacunas de la FCN-UAQ, se desarrolló una proteína quimérica recombinante basada en los epítomos B y T de la proteína VP60 del virus de la EHVC-2 con la cual se realizaron pruebas para una posible dosis vacunal, después de elaborar las vacunas y probarlas con diferentes concentraciones y mediante pruebas de ELISA se determinó que la dosis de 60 µg de proteína mostró el mejor resultado.

El objetivo de este trabajo fue evaluar los péptidos que conforma a esta proteína, se evaluó la generación de anticuerpos de cada péptido (RHDV-1m, RHDV-2m, RHDV-3, RHDV-4m, RHDV-5m, RHDV-6m) y el reconocimiento de los anticuerpos anti-péptido por la proteína quimérica completa. Se formuló una vacuna por cada péptido, con la cual se inmunizaron a dos conejos por vacuna, incluyendo dos conejos control a los cuales solo se les administró adyuvante y PBS. Se realizaron un total de 4 muestreos y 3 inmunizaciones, la primera toma de muestra serológica se realizó 7 días antes de la primera inmunización tomando muestras antes de cada inmunización y después de la última inmunización.

Con los sueros obtenidos se realizaron titulaciones para determinar la concentración de péptido a utilizar, posteriormente se determinó la presencia de anticuerpos tras cada inmunización y se determinaron los títulos de anticuerpos de la última inmunización.

Se observó que todos los péptidos, con excepción del péptido 3, fueron inmunogénicos y los anticuerpos anti-péptidos fueron capaces de reconocer a la proteína recombinante completa, siendo el péptido 5 el que mejores resultados generó. Dichas evaluaciones se realizaron mediante análisis estadísticos para cada titulación de anticuerpos específicos y la evaluación de la inmunogenicidad. Las pruebas realizadas fueron T de Student y ANOVA, con nivel de confianza del 95% ($P < 0.05$), analizando las densidades ópticas (OD) obtenidas de las pruebas ELISA realizadas a cada suero. Se observó que el péptido 3, a pesar de no generar anticuerpos específicos al administrarse solo, los anticuerpos anti-proteína recombinante son capaces de reconocer al péptido.

Palabras clave: EHVC-2, vacuna, conejo.

Summary

Viral Hemorrhagic Disease of Rabbits (VHD), also known as viral septicemia or Chinese plague, is a highly contagious and often fatal disease. In April of 2020, a new outbreak of this disease, considered eradicated, occurred in Mexico, endangering rabbit farming and the balance of the country ecosystem due to numerous endemic lagomorph species in Mexico. At the Immunology and Vaccines Laboratory of FCN-UAQ, a recombinant chimeric protein based on B and T epitopes of the VP60 protein from VHDV-2 virus was developed. Tests were conducted using this protein as a potential vaccine candidate. After producing and testing vaccines with different concentrations and using ELISA tests, it was determined that a dose of 60 µg of protein yielded the best results.

The aim of this study was the evaluation of the peptides that constitute this protein. Antibody generation for each peptide (RHDV-1m, RHDV-2m, RHDV-3, RHDV-4m, RHDV-5m, RHDV-6m) and the recognition of anti-peptide antibodies by the complete chimeric protein were evaluated. A vaccine was formulated for each peptide and two rabbits per vaccine were immunized. Two control rabbits were immunized only with adjuvant and PBS. A total of 4 samplings and 3 immunizations were conducted. The first serological sample was taken 7 days before the first immunization, with samples collected before each subsequent immunization and after the last immunization.

Serum titrations were performed to determine the peptide concentration to be used. The presence of antibodies after each immunization was then determined, along with antibody titers from the last immunization. It was observed that all peptides, except for peptide 3, were immunogenic, and anti-peptide antibodies were able to recognize the complete recombinant protein. Peptide 5 yielded the best results among them. These evaluations were carried out through statistical analyses for each specific antibody titration and immunogenicity assessment. Student's T-tests and ANOVA tests were performed, with a confidence level of 95% ($P < 0.05$), analyzing the optical densities (OD) obtained from ELISA tests performed on each serum. Peptide 3 was found to be capable of being recognized by anti-recombinant protein antibodies, even though it did not generate specific antibodies when administered alone.

Key words: RHD-2, vaccine, rabbits

I. Introducción

La Enfermedad Hemorrágica Viral del Conejo (EHVC), también llamada septicemia vírica o peste china, es una enfermedad altamente contagiosa en la mayoría de los casos fatal; es considerada una enfermedad de notificación obligatoria a nivel internacional, como lo establece la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) en el Artículo 1.1.2, del Capítulo 1.1 del Código Sanitario para los Animales Terrestres. (OIE, 2019).

México contaba con estatus de “enfermedad ausente” ante la OIE, además en 1993 se publicó en el Diario Oficial de la Federación (DOF) el Acuerdo donde se declara el territorio de los Estados Unidos Mexicanos, libre de la enfermedad hemorrágica viral de los conejos después de que transcurrieron 22 meses desde la presentación del último foco activo y se demostró la ausencia de animales serológicamente positivos en las áreas del país que habían estado afectadas (OIE, 2019)

En México, el conejo se consume desde la época prehispánica (tochtli, conejo de campo en náhuatl); sin embargo, la especie europea, tal como se conoce actualmente fue introducida en el país por los colonizadores españoles. La actividad se desarrolló en sistemas de traspatio y la producción se destinaba para autoconsumo (Mendoza, 2001).

La producción de carne de conejo presentó una tasa de crecimiento favorable hasta la presencia de la enfermedad hemorrágica viral conocida como la enfermedad “X” en 1982, dicha enfermedad fue traída a México por un embarque de carne de conejo procedente de China (Roca, 1996).

Después de varios años de ausencia de la EHVC, la producción nacional de carne de conejo fue creciendo y para el año 2007 fue de 500,349 cabezas, se estima que, de esta producción, el 80% es realizado de manera familiar, el 20% que resta es realizado de manera semi intensivo e intensivo, donde se utilizan métodos y técnicas modernas (INEGI, 2007).

México ocupa el vigésimo lugar mundial como productor de carne de conejo, con alrededor de 15 mil toneladas al año, de las cuales 12 mil 500 son de pequeña escala de aquí la importancia de preservar la salud de esta especie productora (Arroyo C., 2012).

En abril del año 2020 se dio la reaparición en México de la enfermedad hemorrágica viral del conejo. En el suroeste de los Estados Unidos (Arizona, California, Colorado, Nevada, Nuevo México y Texas), surgieron preocupaciones sobre la salud de las granjas de conejos domésticos y de razas exóticas mantenidas como mascotas en el norte de México, pero también las poblaciones de especies nativas de conejos y liebres silvestres. (Lorenzo C, 2020)

Las vacunas preventivas han llegado al control o eliminación de muchas enfermedades infecciosas que alguna vez cobraron muchas vidas, ejemplo como la victoria mundial contra la viruela o el programa para la eliminación de la poliomielitis. Estos programas liderados por la OMS y varios donantes indican que los números de los casos de poliomielitis se redujeron en el mundo más del 95% hacia el año 2000. (Owen J, 2014)

El uso de vacunas para la EVHC no están aprobadas para uso comercial en los países considerados libres de la enfermedad y la mejor manera de proteger a los conejos se basa en prácticas mejoradas de bioseguridad, cabe señalar que actualmente se encuentra disponible la vacuna tanto para VEHC/VECHa y VECH2, sin embargo, existe una protección cruzada limitada nula entre estos dos grupos de virus, es decir, que se debe elegir el tipo de vacuna de acuerdo a la variante de la que se busque inducir una reacción inmunogénica (Spickler, 2020).

II. Antecedentes

2.1 Enfermedad Hemorrágica Viral del Conejo (EVHC)

La enfermedad hemorrágica del conejo fue detectada por primera vez en China en 1984, en 1987 en Corea y en 1988 se diseminó en Europa. El primer brote de EHVC reportado en el hemisferio occidental, corresponde al ocurrido en México en 1988, provocado por la importación ilegal de canales de conejo originarias de China y procedentes de los Estados Unidos de América (EUA). Posterior a esto, la enfermedad se presentó en Cuba, en mayo de 1993 y en los Estados Unidos de América (EUA) en abril de 2000, países que han sufrido reapariciones de la enfermedad (SENASICA, 2020)

La EHVC afecta a conejos domésticos y silvestres (*Oryctolagus cuniculus*) principalmente, es causada por un virus ARN, el “Virus de la Enfermedad Hemorrágica del Conejo (VEHC)”, perteneciente al género Lagovirus, familia Caliciviridae. Se conoce sólo un serotipo y los análisis filogenéticos de cepas patogénicas del VEHC indican la existencia de tres grupos distintos: el VEHC clásico con los genogrupos G1 – G5 aislados desde 1984, el antigénico variante VEHCa / G6 identificada en 1996, y VEHC2 identificado en Francia en 2010 el cual desde entonces se ha extendido por Europa (OIE, 2019)

El VEHC se transmite por contacto directo con animales infectados y por fómites, las principales vías de contagio son la oral, nasal y conjuntival, además del contacto con cadáveres o pelo de un animal infectado, alimentos contaminados, agua y camas; las moscas y otros insectos son vehículos eficientes. La replicación del virus

no parece ocurrir en predadores o carroñeros, aunque estos animales pueden excretar el VEHC en las heces luego de comer conejos infectados. Se ha observado que el virus sobrevive a la exposición de pH 3.0, y temperaturas de 50 °C por una hora así como a los ciclos de congelación - descongelación, puede permanecer por meses en la carne de conejo refrigerada o congelada, así como en los cadáveres en descomposición (Spickler, 2020).

En las infecciones hiperagudas, los conejos desarrollan fiebre y mueren súbitamente entre las 12 a 36 horas; en la presentación aguda, se puede observar anorexia, congestión de la conjuntiva palpebral o postración, también pueden desarrollar signos neurológicos como falta de coordinación, excitación, movimiento de pedaleo y convulsiones, algunas veces, aparecen signos respiratorios, incluidos disnea y descarga nasal sanguinolenta, también se pueden observar lagrimeo y hemorragias oculares, los animales que se recuperan de la enfermedad aguda desarrollan ictericia grave, con pérdida de peso y letargo, y mueren en unas pocas semanas. En las presentaciones de infecciones por VEHC / VEHCa el índice de morbilidad varía de 30% a 100%, y el índice de mortalidad es de 40% a 100%, los índices más altos de morbilidad y mortalidad se ven en los conejos adultos de poblaciones expuestas por primera vez. En los conejos silvestres, los brotes pueden ser estacionales, y en algunas poblaciones han sido asociados con la estación reproductiva. No existe evidencia de que el virus infecte a los humanos (Spickler, 2020)

2.2 Patogenia

La transmisión puede ocurrir por contacto directo con animales infectados que excretan sus partículas virales por las secreciones y excreciones o indirectamente con fómites contaminados, agua, pelo, etc. (Ohlinger, 1993). Los ectoparásitos también pueden transmitir la enfermedad, principalmente artrópodos como los piojos y las pulgas, así como mosquitos, garrapatas y moscas (Ramirez I, 2021)

En las infecciones naturales, la ruta oro-fecal está considerada la ruta preferente de transmisión. El virus se une a unos antígenos denominados HBGA H tipo 2 presentes en la superficie de las células epiteliales de las vías aéreas superiores y del tracto digestivo (Abrantes J, 2012). La expresión de estos ligandos en la superficie celular se relaciona con el grado de infección, observándose que una menor expresión se asocia a animales con menor susceptibilidad a la infección (Nyström, 2011). Esta disminución en la expresión de los ligandos HBGA también justifica en parte la resistencia a la infección de conejos menores de 2 semanas (Abrantes J, 2012).

Las lesiones más graves tienen lugar en el hígado, donde el virus se disemina tras las primeras horas de infección, vía sanguínea, probablemente tras su replicación en macrófagos atendiendo a la vía de entrada del virus (Kimura, 2001). El virus se replica en el citoplasma de los hepatocitos localizados principalmente en áreas centroacinares. El número de células infectadas se incrementa con el curso de la enfermedad alcanzando su máximo a las 36-48h. Los hepatocitos mueren por fenómenos de autofagia y apoptosis, contribuyendo a una replicación y difusión más efectiva del virus (Vallejo, 2014); (Trzeciak-Ryczek, 2015).

En los conejos adultos el componente predominante en la inflamación del hígado son los heterófilos. En cambio, en los conejos jóvenes menores de 2 semanas se ha visto que el componente mayoritario son los linfocitos que tienen una respuesta más efectiva y específica que los heterófilos. Esta diferencia en la respuesta innata también justifica en parte la resistencia de conejos jóvenes a la infección. Desde el hígado, la infección se puede diseminar, a través de los macrófagos, hacia otros órganos (Abrantes J, 2012).

Cuadro 1 Lesiones macroscópicas y microscópicas observadas en animales en enfermedad hemorrágica del conejo.

Órgano	Lesiones
Hígado	Aumentado de tamaño, con marcado patrón lobular. Coloración grisácea – amarillenta y consistencia friable. Infiltraciones de granulocitos, alteraciones degenerativas (vacuolización) de los hepatocitos compatible con apoptosis, activación de células de Kupffer
Tráquea	Hiperemia de la mucosa, petequias o hemorragias difusas, a veces con presencia de espuma sanguinolenta.
Pulmón	Hiperemia, edema pulmonar (espuma en la tráquea), hemorragias. Histológicamente las hemorragias son intra-alveolares y perivasculares. En ocasiones se observa bronquiolitis catarral con proliferación de linfocitos
Riñones	Aumento de tamaño, hiperemia y hemorragias. Histológicamente las hemorragias se observan en los glomérulos y médula renal, con trombos hialinos (perdida de proteínas), túbulos dilatados, infiltración linfocítica y degeneración del epitelio tubular.
Bazo	Esplenomegalia (aumento de tamaño), hiperemia y hemorragias. A nivel histológico puede observarse cariorrexis en los folículos, hemosiderosis y leucopenia.
Tracto Digestivo	Ocasionalmente enteritis y hemorragias en la serosa intestinal
Cavidad Abdominal Y torácica	Ocasionalmente exudado sanguinolento o hemorragias en las serosas.
Musculatura	Petequias en el músculo cardíaco. Histológicamente puede observarse necrosis focal en miocardio, alteraciones degenerativas y hemosiderosis.
Sistema Nerviosos Central	Congestión y hemorragias en las meninges del cerebro y cerebelo. Histológicamente puede observarse ocasionalmente encefalomielitis no purulenta.

Adaptado de Abrantes et al., 2012

2.3 Signos clínicos y lesiones

El periodo de incubación varía entre 1 y 3 días con la variante clásica GI.1, siendo más largo (3-5 días) con la nueva variante GI.2. Los conejos normalmente sucumben entre las 12-36 horas tras el comienzo de la fiebre ($>40^{\circ}\text{C}$). Dependiendo de la evolución clínica de la enfermedad, se describen tres cursos clínicos diferentes (Marcato, 1991), en la forma sobreaguda los animales infectados no muestran signos clínicos y mueren repentinamente. Ocurre cuando la infección aparece en una colonia de conejos donde no estaba presente el virus. La forma aguda viene acompañada por anorexia, apatía, congestión de la conjuntiva palpebral y signos neurológicos como excitación, parálisis y ataxia, principalmente. También hay signos respiratorios como tos, disnea, cianosis, descarga nasal sanguinolenta (epistaxis) y lagrimeo ocular. Se da en áreas donde la EHC se encuentra estabilizada y los conejos siempre presentarán signos clínicos antes de la muerte. En la forma subaguda los animales tienen síntomas más leves y la mayoría de ellos sobreviven. Puede observarse ictericia (mucosas amarillentas, hígado amarillento, líquido libre de color amarillento) debido a la afección hepática. En esta fase desarrollan anticuerpos que les dan protección para una próxima reinfección (Ramirez I, 2021).

Se ha descrito que muy pocos conejos presentan una forma crónica de la enfermedad, aunque los signos nerviosos pueden ser vistos en estadios tardíos, como movimientos de pataleo, ataxia o comportamiento frenético y chillidos antes de morir (Abrantes J, 2012).

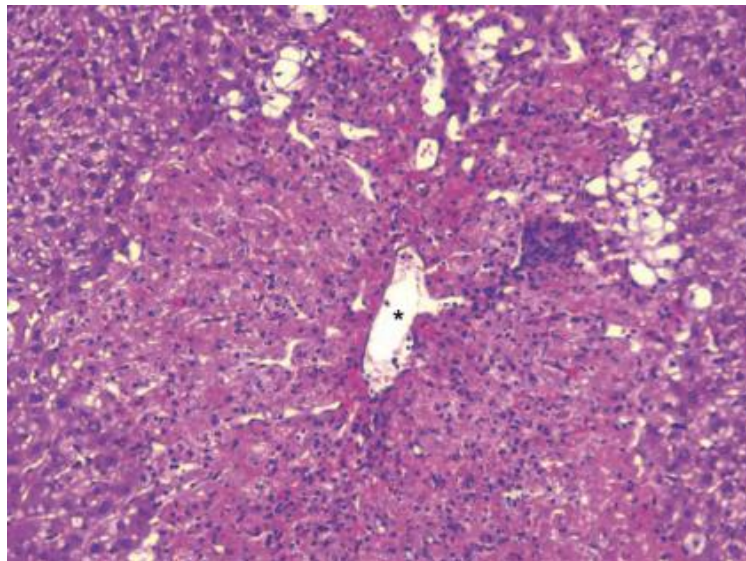


Figura 1 Imagen microscópica del hígado. se observa necrosis centrolobulillar. Alrededor de la vena centrolobulillar () los hepatocitos se tiñen más rosas (acidófilos), con rotura de núcleos (cariorrhexis) y hemorragia. Hematoxilina-eosina obtenido de (Marques RM, 2010)*

Con la nueva variante GI.2 se observa más frecuentemente una evolución crónica o subclínica, pudiendo diseminar el virus durante más tiempo, dificultando su erradicación (Gleeson M., 2020). Los primeros órganos en verse afectados son hígado, pulmón y bazo (Cuadro 1). El aspecto del hígado suele ser pálido y de consistencia friable o de color rojo oscuro y aumentado de tamaño (congestivo). La principal lesión histopatológica es una hepatitis necrótica con hemorrágicas multifocales (Figura 1), producida por una pérdida de hepatocitos a causa de la apoptosis inducida por el virus. Otro órgano donde se aprecian lesiones es el bazo, con esplenomegalia (aumento del tamaño del bazo) y color más oscuro debido a la congestión (Figura 2).

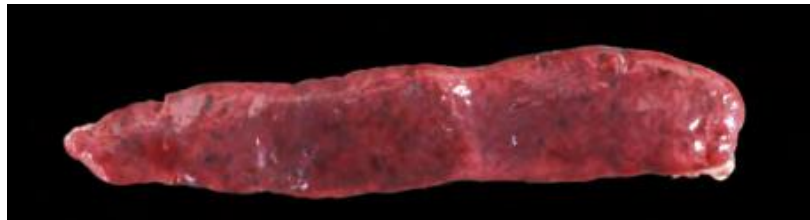


Figura 2 Bazo con esplenomegalia obtenido de Marques et al., 2010

Una vez se produce la coagulación intravascular diseminada (CID), muchos órganos pueden presentar hemorragias y congestiones, sobre todo tráquea, pulmones (Figura 3), corazón y riñones, que dará como resultado la muerte del conejo al provocar fallo multiorgánico. El CID se manifiesta a nivel histológico por la presencia de coágulos en los vasos sanguíneos de muchos órganos. Además, el agotamiento de los linfocitos T y B, principalmente en el hígado y en el bazo contribuye a la incapacidad de producir una respuesta inmunitaria efectiva y a una progresión fatal de la enfermedad en 2-3 días (Marques RM, 2010)



Figura 3 Hemorragia y congestión en pulmón obtenido de Marques et al., 2010.

Por otro lado, los conejos resistentes a la enfermedad desarrollan grandes títulos de IgM (y posteriormente de IgA e IgG) sobre el tercer día post-infección,

produciendo una respuesta inmunitaria humoral. El tracto digestivo no suele afectarse, pero se han reportado casos de enteritis (Marcato et al. 1991), a pesar de la descripción característica de hemorragias en la enfermedad, no siempre se observa este hallazgo (Ramirez I, 2021).

En los casos de EHC aguda, uno de los hallazgos clásicos relacionados con la enfermedad es la descarga nasal sanguinolenta o epistaxis (Figura 4). Sin embargo, la presencia de sangre en la cavidad nasal es inespecífica y debe ir acompañada de otras lesiones típicas de la enfermedad, por lo que no puede descartarse EHC por la ausencia de esta lesión (Rosell, 2019).



Figura 4 Descarga nasal sanguinolenta o epistaxis obtenido de Rosell et al., 2029.

2.4 Epidemiología

El primer brote reportado en el hemisferio occidental corresponde al ocurrido en México en 1988, provocado por la importación ilegal de canales de conejo originarias de China y procedentes de los Estados Unidos de América (EUA). Posterior a esto, la enfermedad se presentó en Cuba, en mayo de 1993 y en los EUA en abril de 2000, países que han sufrido reapariciones de la enfermedad, en varias ocasiones. Para fines de 1990, se registraron brotes en 40 países, y la EHVC se había vuelto endémica en las poblaciones de conejos silvestres de Europa (OIE, 2019)

EUA ha informado de 130 focos detectados en los estados de Arizona (51), California (2), Colorado (9), Nevada (1), Nueva York (1), Texas (23) y Nuevo México (43), lo cual lo convierte en el país con más focos reportados a la OIE desde 2015, cabe señalar que México también cuenta con un evento activo (Figura 5; Mapa 1) (OIE, 2019).

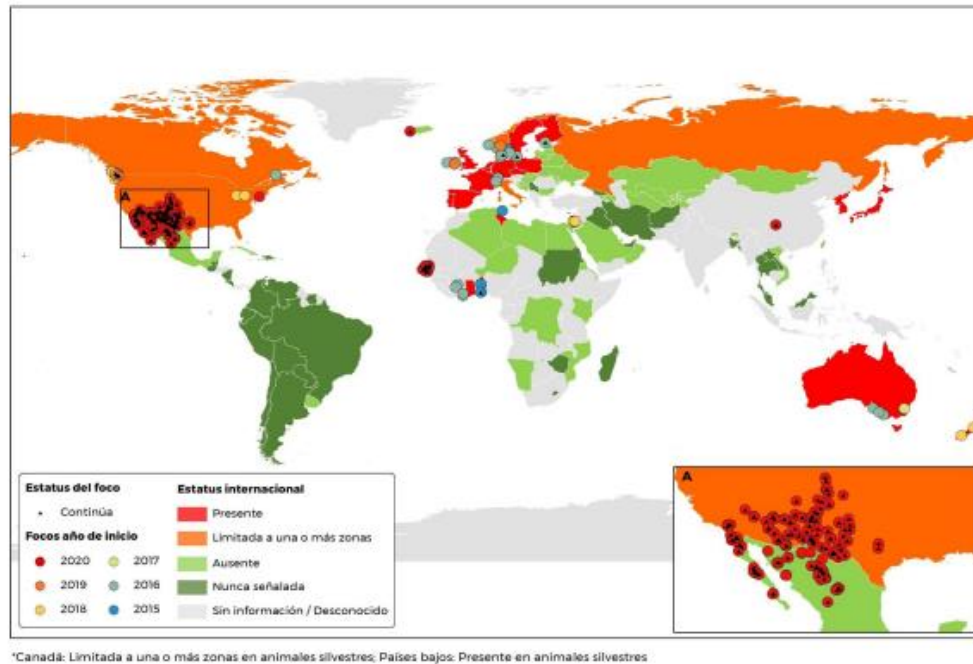


Figura 5 Mapa 1, Estatus mundial en 2019 y focos de la EVHC del 2015 a Junio del 2020 obtenido de OIE et al., 2019.

Del total de focos reportados a nivel mundial, en este periodo de 2015 a 2020, el 24% está resuelto y el 76% continúa activo (OIE, 2019).

El virus causante de esta enfermedad es un agente que resiste niveles de pH 3.0, y que incluso es estable en un rango de pH 4.5-10.5, además puede resistir viable por largos períodos fuera del hospedador (hasta por 3 o 4 meses), la temperatura ambiental y la protección mediante la materia orgánica son factores relevantes para mantener su forma infectiva, el virus puede mantenerse viable por 22-35 días a una temperatura de 22 °C, pero sólo 3-7 días a 37 °C (USDA, 2020), por lo tanto, la diseminación mecánica del virus podría estar determinando la velocidad y rango geográfico de transmisión de la enfermedad en escalas limitadas a su medición sobre todo en las poblaciones silvestres (Cooke, 2002).

2.5 Mecanismos de trasmisión

En diferentes referencias bibliográficas se habla de los distintos mecanismos de transmisión del EHVC fuera del contacto directo interespecie en las poblaciones de leporídeos domésticos y silvestres, por ejemplo, a través de insectos, viento, agua y forrajes contaminados, fómites (calzado, ropa, llantas de los vehículos, etc.), mamíferos silvestres y ferales (perros y gatos), aves rapaces y carroñeras, entre otros (Cooke, 2002).

2.5.1 Carnívoros

De acuerdo con diferentes investigaciones realizadas en zorros rojos (*Vulpes vulpes*), se ha concluido que estos mamíferos carnívoros pueden generar anticuerpos contra la EHVC después de la ingesta de conejos infectados por la enfermedad, sin embargo, no manifiestan signos clínicos ni existe evidencia de replicación viral, por lo que no pueden transmitir el virus directamente a otros animales, sin embargo, debido a las propiedades físico-químicas el VEHC puede resistir la degradación del tracto gastrointestinal de los depredadores, esto fue demostrado por (Leighton, 1995), Se dice entonces que los zorros que se alimentan de lepóridos infectados pueden contribuir a la diseminación de la enfermedad entre las poblaciones susceptibles, llevando el virus a nuevas áreas a través de las heces (Frölich Kai, 1998).

2.5.2 Moscas

Estudios en la década de los 90 identificaron que la especie *Musca vetustissima* (mosca del arbusto australiano) y moscas del género *Phormia spp.* podrían transmitir el virus en condiciones de laboratorio; también se llegó a demostrar que tan sólo 10 partículas virales podrían ser capaces de inducir la enfermedad en conejos al ser inoculadas en la conjuntiva (Asgari S, 1998).

2.5.3 Pulgas

Al igual que los mosquitos, las especies de pulgas de conejos *Spilopsyllus cuniculi* y *Xenopsylla cunicularis* resultaron positivas al virus tras alimentarse de conejos infectados y fueron capaces de transmitir el virus en condiciones de laboratorio (Cooke, 2002).

2.6 Situación en México

De acuerdo con los antecedentes históricos de la EHVC, ésta fue detectada en el mes de diciembre de 1988, en un poblado de Ecatepec, Estado de México, a través de un cuadro de morbilidad y mortalidad que produjo en pocos días la pérdida de 1,600 animales, fue entonces cuando las autoridades establecieron estrategias para el tratamiento de la enfermedad (OIE, 2019).

En enero de 1989, el personal del Sistema Nacional de Emergencia en Salud Animal (SINESA) elaboró un programa de erradicación contemplando las siguientes medidas: comunicación social, cuarentena y restricciones en la movilización de embarques de conejos y sus productos o subproductos derivados, sacrificio, limpieza y desinfección de unidades de producción cunícola y operativos de vigilancia epidemiológica (DOF, 1989) (Figura 6; Mapa 2).



Figura 6 Mapa 2, Estados afectados por el evento epidemiológico de EHV-1 en México (1988-1991) obtenido de SINASA et al., 1989.

El último brote de la enfermedad se registró en abril de 1991. Desde inicios de 1992 el Consejo de Sanidad Animal (CONASA) comenzó a elaborar el documento técnico para la declaración de México como país libre de la enfermedad y el 20 de enero de 1993 fue publicado este documento en el DOF, siendo el primer país en erradicar la EHV-1 de su territorio, cabe señalar que debido a esta condición actualmente la vacunación está prohibida en México (Ruiz Lang, 1993) (DOF, 1989).

Por otro lado, en materia de biodiversidad, la orden *Lagomorpha*, a la que pertenecen los conejos y las liebres silvestres, es muy importante ya que en el territorio se alberga una gran diversidad de estas especies. Los lepóridos mexicanos agrupan a tres géneros con 14 especies cuya distribución geográfica incluye a toda la República Mexicana: *Lepus* (liebre), *Romerolagus* y *Sylvilagus* además de seis especies de conejo endémicas. De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo., diez especies están en alguna categoría de riesgo; para agencias internacionales, como la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza, seis están en peligro de extinción (Fernández, 2015) (Figura 7; Mapa 3).

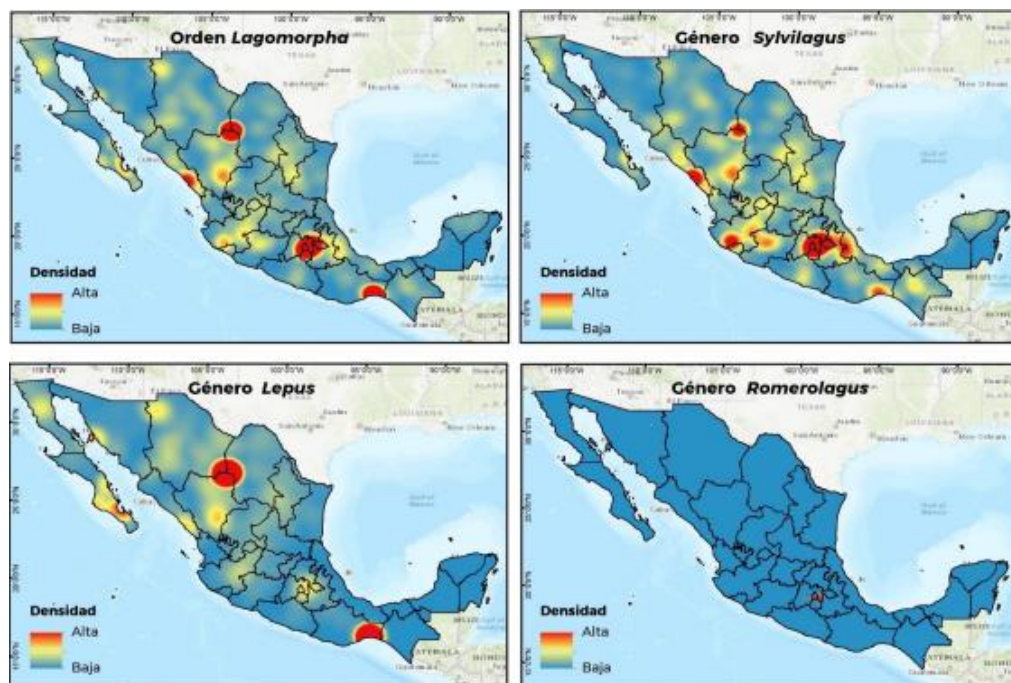


Figura 7 Mapa 3, Biodiversidad del Orden Lagomorpha avistados en México obtenido de SENASICA et al., 2020

La cunicultura en México puede dividirse en tres grupos: tecnificado, semitecnificado y rural o familiar (traspatio), esta última es la más habitual y por lo general es una actividad que generalmente se desarrolla en pequeñas explotaciones con escasas medidas sanitarias y de manejo. De acuerdo con datos del Sistema Nacional de Identificación Individual del Ganado (SINIIGA), los estado con mayor cantidad de unidades de producción (UP) cunícola registradas son México e Hidalgo, el primero cuenta con 3,885 UP (34%) y un total de 293,332 animales (26%), el segundo 1,064 UP (9%) y 274,811 conejos (25%); la población nacional de conejos estimada es de 11,560 UP con 1,108,350 animales (412,565 vientres, 386,795 crías, 226,585 de engorda, 40,500 sementales y 41,905 reemplazos) (SINIIGA, 2020)(Figura 8; Gráfica 1) (Figura 9; Mapa 4).

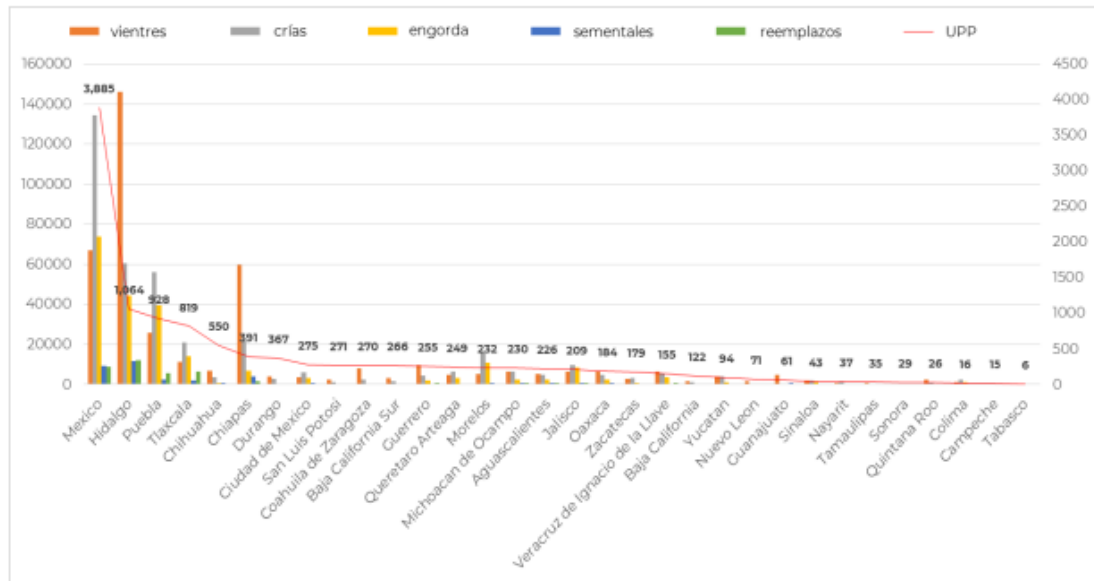


Figura 8 Grafica 1, Unidades de producción cunícola registradas en SINIIGA e inventario nacional obtenido de SINIIGA et al., 2020.



Figura 9 Mapa 4, Densidad de unidades de producción cunícola obtenido de SENASICA et al., 2020.

El 3 de abril del 2020, derivado de la vigilancia epidemiológica que realiza este Servicio Nacional mediante la aplicación “AVISE” se recibió la notificación de mortalidad de conejos de traspatio en el municipio de Nuevo Casas Grandes en el estado de Chihuahua cuya notificación fue atendida el 4 de abril por personal adscrito a la Dirección General de Salud Animal, encontrando en el predio afectado 11 animales muertos de 13 que enfermaron en una población total de 30 conejos

domésticos, por lo cual se procedió al diagnóstico y los resultados fueron positivos a la EVHC, cabe hacer mención que el predio fue despoblado, sanitizado y desinfectado en su totalidad, este evento corresponde al Foco Índice (FI) (SENASICA, 2020) (Figura 10; Mapa 5).

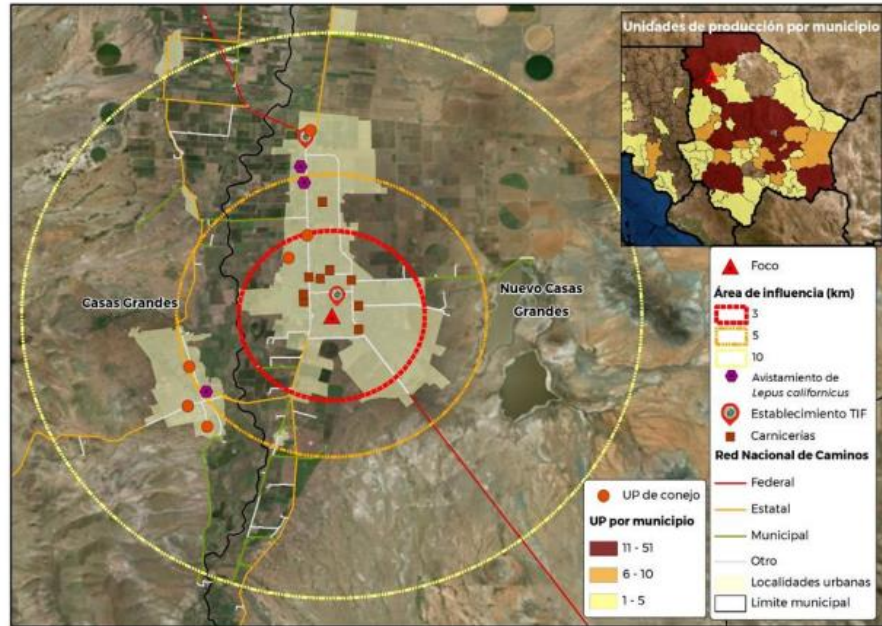


Figura 10 Mapa 5. Ubicación del foco índice de EVHC en Nuevo Casa Grande, Chihuahua. obtenido de SENASICA et al., 2020.

El 10 de abril del 2020 el evento fue notificado a la OIE, se han reportado 62 focos en seis informes de seguimiento, los cuales fueron localizados en los estados de Baja California (5), Baja California Sur (6), Chihuahua (34), Coahuila (6), Durango (1) y Sonora (10) (OIE, 2019). Es importante señalar que mediante los análisis realizados por el Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal (CENAPA) se identificó por medio de secuenciación masiva paralela de 7,521 pares de bases al VEHC subtipo 2 (VEHC2/b) como la variante que afecta a leporídeos domésticos y silvestres en México (DGSA, 2020).

De acuerdo con el Sistema de Información Nacional de Enfermedades Exóticas y Emergentes (SINEXE), se han confirmado 87 investigaciones positivas en animales domésticos en los estados de Baja California (19), Baja California Sur (10), Chihuahua (36), Coahuila (6), Durango (5), Sonora (9) y Zacatecas (2), y 13 en animales silvestres en Chihuahua (10), Sonora (2) y Durango (1) (SENASICA, 2020) (Figura 11; Mapa 6).

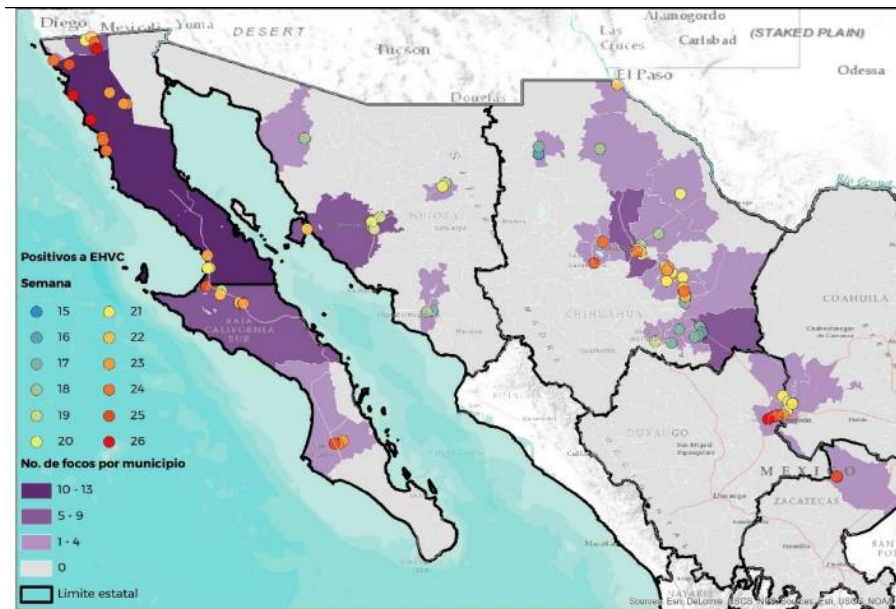


Figura 11 Mapa 6, Investigaciones positivas de EVHC por semana y municipio obtenido de SENASICA et al., 2020.

Para el caso particular de México, el valor de los animales afectados por el brote de EHVC en el estado de Chihuahua durante el 2020 se estima en 9,000.00 pesos, que representa el 0.28% del valor del inventario estatal (3,196,080.00 pesos). En virtud de que la enfermedad es mortal, se realizó un análisis del impacto que causaría en caso de presentarse (Mendoza, 2001).

En nuestro país la producción cunícola se realiza en tres sistemas: 1) Producción empresarial o comercial (aprox. el 5% de la población); 2) Producción semi empresarial o comercial (aprox. 15% de la población); 3) Producción familiar de traspatio (80% de la población animal), que se orienta básicamente al autoconsumo; venta de los excedentes de producción (Alvarez, 2001) (Mendoza, 2001).

De acuerdo con lo reportado por la FAO, el crecimiento del inventario nacional de conejos mantiene una tendencia al alza con una tasa anual promedio de 0.43% para el periodo 2010 a 2018 (SENASICA, 2020) (Figura 12; Gráfica 2).

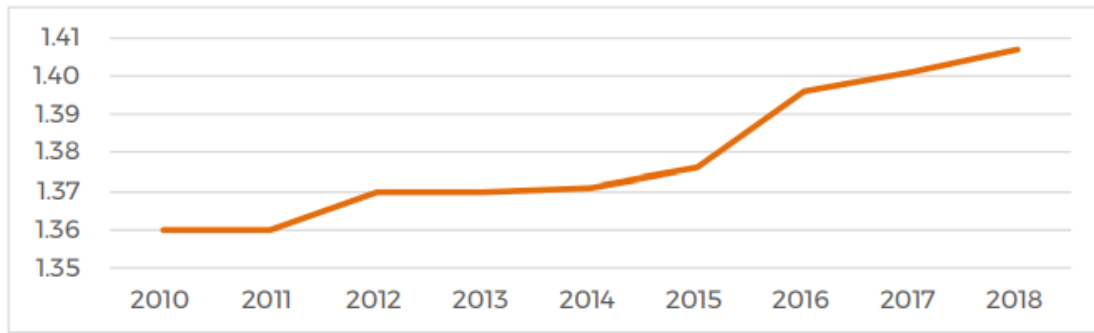


Figura 12 Grafica 2, Inventario Histórico de conejos y liebres de México (Millones de cabezas) obtenido de SINIIGA et al 2020.

En relación con dicha tendencia, se observa un incremento anual de 8.93% en el volumen de carne producido y por ende en su valor, lo que para el año 2018 representa el 0.31% del valor de la producción pecuaria nacional (SENASICA, 2020) (Figura 13; Gráfica 3).

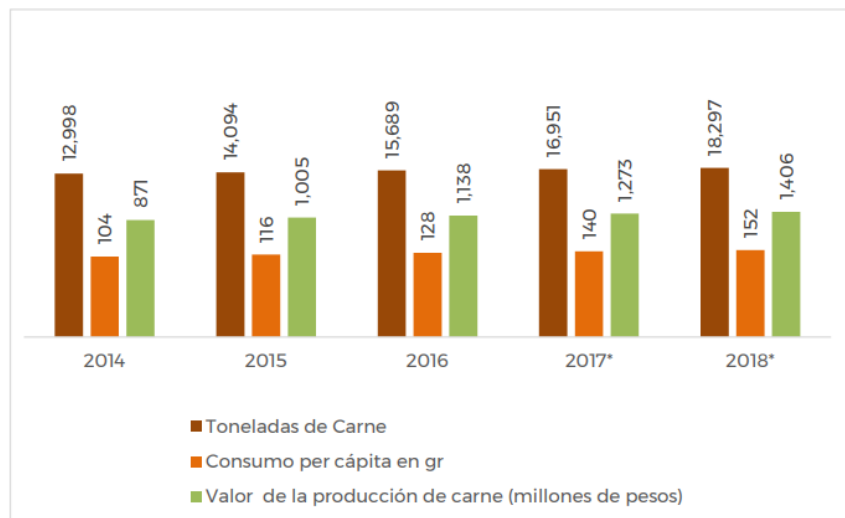


Figura 13 Grafica 3, Producción nacional histórico de carne de conejo obtenido de SINIIGA et al., 2020.

Para el año 2019 SINIIGA reporta 11,560 unidades activas de producción de conejos con un inventario de 1.16 millones de cabezas. El valor de dicho inventario se estima en 278.83 millones de pesos. El inventario nacional de conejos se compone principalmente de vientres y crías con 37% y 35% respectivamente, del total nacional (SENASICA, 2020). (Figura 14; Gráfico 4)

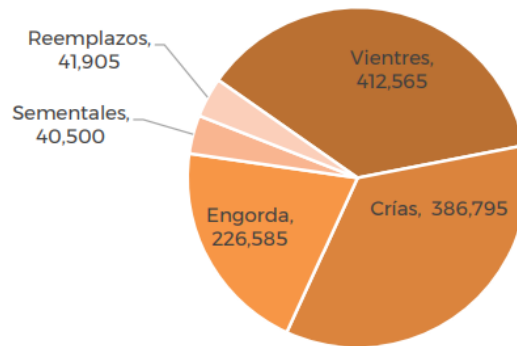


Figura 14 Grafica 4, Composición del inventario nacional de conejos 2020 (cabezas) obtenido de SINIIGA et al., 2020.

Durante el año 2020 el SINIIGA reporta que Estado de México, Hidalgo y Puebla disponen del 62.82% del inventario nacional (SENASICA, 2020).

2.7 Vacunas

La vacunación es una forma sencilla, inocua y eficaz de protegernos contra enfermedades dañinas antes de entrar en contacto con ellas. Las vacunas activan las defensas naturales del organismo para que aprendan a resistir a infecciones específicas, y fortalecen el sistema inmunitario (OMS, 2021).

Tras vacunarnos, nuestro sistema inmunitario produce anticuerpos, como ocurre cuando nos exponemos a una enfermedad, con la diferencia de que las vacunas contienen solamente microbios (como virus o bacterias) muertos o debilitados y no causan enfermedades ni complicaciones (OMS, 2021).

La mayoría de las vacunas se inyectan, pero otras se ingieren (vía oral) o se nebulizan en la nariz (OMS, 2021).

2.8 Vacunas recombinantes

Con el ejemplo de la vacuna frente a la hepatitis B, este tipo constituye la primera gran vacuna tecnológica e inicio de la revolución en este campo. En primer lugar, es imprescindible identificar el antígeno que pueda dar lugar a una respuesta protectora para posteriormente realizar la detección y la obtención del genoma responsable de la elaboración de este antígeno. Dicha porción del genoma se inserta en otro microorganismo (p. ej., *Saccharomyces cerevisiae*) de forma que fabrique el antígeno deseado en grandes cantidades que se recoge, y purifica, para obtener una vacuna de producción ilimitada y absolutamente segura (Picazo JJ, 2007).

Los antígenos recombinantes poseen un alto grado de pureza. A causa de esto tiene baja inmunogenicidad al no poseer PAMPs. (shah et al., 2015). La adición de adyuvantes reduce la cantidad de antígeno por dosis de vacuna, aumenta la duración de la respuesta inmune, aumenta la memoria inmune y disminuye la frecuencia de la inmunización necesaria (shah et al., 2015).

Actualmente existen vacunas aprobadas para uso veterinario basadas en proteínas recombinantes contra enfermedades en gatos (leucemia felina), cerdos (circovirus porcino tipo 2, parvovirus porcino y fiebre porcina clásica) y perros (leishmaniosis canina) (Cid, 2021).

2.9 Adyuvantes

Se trata de sustancias utilizadas para aumentar la respuesta inmunitaria a un antígeno, la mayoría a través de la activación de las células dendríticas y su capacidad para procesar y presentar antígenos y para atraer y activar linfocitos T (Mount A, 2014)

Desde 1920 hasta hace poco eran ampliamente utilizadas las sales de aluminio, cuyo mecanismo exacto de acción sigue sin conocerse aún y se han visto relacionadas a algunas reacciones. Este hecho, junto a su deficiencia en estimular la inmunidad celular, ha promovido la búsqueda de nuevas sustancias (Mount A, 2014). El primero de la nueva era de adyuvantes fue el MF59 (emulsión de aceite de escualeno en agua, Tween 80 y Span 85), que induce una gran respuesta de anticuerpos de mayor diversidad y afinidad en la vacuna de la gripe y se prepara para otros antígenos, como HIV o hepatitis C (Olafsdottir T, 2015).

2.10 Vacunas a nivel mundial contra VEHC

Eravac es una vacuna veterinaria creada por la Unión Europea que se utiliza en conejos para reducir la mortalidad causada por la enfermedad hemorrágica del conejo (EHC), una enfermedad que suele ser mortal y está causada por una nueva variante del virus de la EHC, denominada virus EHC tipo 2 (EMA, 2019).

El virus EHC tipo 2 se diferencia del virus EHC clásico en que tiene una evolución de la enfermedad más prolongada, las muertes se producen más tarde y se prolongan durante más tiempo, y hay un mayor número de muertes entre los conejos jóvenes. El principio activo de Eravac es el virus de la enfermedad hemorrágica del conejo tipo 2 inactivado, cepa (V-1037) (EMA, 2019).

Para la EHVC y la EHVC-2 se han probado de manera experimental vacunas con tecnología recombinante que han demostrado ser efectivas y conferir protección contra estas enfermedades (Bárcena, 2000)

2.11 Vacunas en México contra VEHC

VEHC-2-BIVE es la primera y única vacuna en México para conejos autorizada y administrada por la Secretaría de Agricultura para la prevención de la enfermedad hemorrágica del conejo tipo 2 para conejos silvestres y de compañía con una inmunidad anual. (SENASICA, 2020)

VEHC-2-BIVE es una vacuna monovalente inactivada contra el virus hemorrágicos del conejo tipo 2 (VEHC-T2) que está recomendada para aplicarse en conejos mayores a 8 semanas de edad (SENASICA, 2020)

2.12 Prueba de ELISA como diagnóstico

Para evaluar la inmunidad cuando los animales de una explotación enferman o con un aumento en el índice de mortalidad es necesario obtener un diagnóstico certero de la causa o causas que lo originan con la mayor brevedad posible, tomar las medidas adecuadas para garantizar la salud del resto de los conejos de la explotación y evitar mayores efectos negativos, tanto productivos como económicos (Penadés M, 2011).

Sin embargo, el diagnóstico etiológico es difícil y, en la mayoría de los casos, está supeditado a la calidad de las muestras analizadas. Por ello, es fundamental realizar una correcta toma de muestras para cada situación, conservarlas y enviarlas adecuadamente, para facilitar el diagnóstico laboratorio (Penadés M, 2011).

El ensayo de ELISA tiene como fundamento la detección de un antígeno por un anticuerpo unido a un marcador bioluminiscente. En estos ensayos se fija mediante absorción pasiva a una superficie, generalmente en placas de poliestireno (Lin, 2016)

III. Hipótesis

Los péptidos de la proteína VP60 inducen una respuesta inmunitaria la cual genera anticuerpos específicos.

IV. Objetivos

4.1 Objetivo General

Demostrar que los péptidos de la proteína VP60 del VEHC son inmunogénicos y generan anticuerpos específicos.

4.2 Objetivos Específicos

1. Evaluar la generación de anticuerpos contra cada péptido sintético (RHDV-1m, RHDV-2m, RHDV-3, RHDV-4m, RHDV-5m, RHDV-6m)

2. Determinar que los anticuerpos generados por cada péptido sintético tienen la capacidad de reconocer a la proteína VP60.

V. Material y Método

5.1 Materiales para la Elaboración de Vacunas:

- Péptidos Sintéticos
- PBS estéril (Phosphate Buffer Saline)
- Agua estéril
- Micropipetas
- Puntas para micropipetas
- Tubos cónicos de 1.5 ml estériles
- Tubos cónicos de 15 ml y 45 ml estériles
- Jeringas con aguja de 5 ml
- Agitador Vortex
- Potenciómetro
- Cabina de bioseguridad
- Autoclave
- Bascula
- Adyuvante (Montanide ISA 71)
- Homogeneizador
- Microscopio
- Desinfectante (Cloruro de Benzalconio)
- Sonicador
- Porta objetos y cubre objetos
- Papel aluminio

5.2 Materiales para la Inmunización y el Muestreo de los conejos:

- Jeringas con aguja de 5 ml
- Vacunas
- Agujas de 22G
- Centrifugas
- Campana de flujo laminar
- Torundas con alcohol
- Tubos vacutainer rojos
- Refrigerantes
- Tubos cónicos 200 µl estériles
- Hielera
- Trampas para muestrear
- Termómetro
- Gradilla
- Micropipetas
- Puntas para micropipetas
- Tubos cónicos de 1.5 ml estériles

5.3 Materiales para la elaboración de las ELISAs

- PBS-T (Phosphate Buffer Saline - tween)
- Leche en polvo descremada (Svelty)
- Placas de ELISA de 96 pozos
- Micropipetas
- Puntas para micropipetas
- Buffer de Carbonatos
- Tubos cónicos de 1.5 ml
- Tubos cónicos de 15 ml y 45 ml
- Lector de placas
- Agitador Vortex
- Potenciómetro
- Incubadora
- Péptidos diluidos
- Suero de conejo positivo
- Solución de bloqueo
- Anticuerpo primario (suero de conejos inmunizados)
- Anticuerpo secundario (anti-conejo IgG H + L HRP Jackson Immuno Research, West Grove, PA, EE.UU.; Code: 711-035-152)
- Plástico film transparente
- Solución de revelado (se prepara en el momento del revelado).
- Protector para placas (aluminio)

5.4 Método para la Elaboración de las Vacunas:

Para realizar el pesaje de los péptidos, primero, se realizó por triplicado el pesaje de los tubos de 1.5 ml vacíos donde se contendría cada péptido, para garantizar que no existe variación en la báscula. Los pesajes se realizaron, cerráramos y aseguro la puerta del cuarto donde se encuentra la balanza para evitar corrientes de aire.

Posteriormente los 6 péptidos pertenecientes a la proteína VP60 (RHDV-1m, RHDV-2m, RHDV-3, RHDV-4m, RHDV-5m, RHDV-6m) fueron pesados, midiendo masas entre 1 y 2 mg de cada péptido. A cada tubo con péptido se le añadió la cantidad necesaria de PBS estéril para ajustar la concentración de cada péptido a 2 mg/ml (Cuadro 2).

Cuadro 2 Pesaje de los péptidos para la concentración de 2mg/ml

Péptido	Pesos tubo de 1.5 vacío	Promedio del peso tubo de 1.5 ml	Peso del Péptido	Cantidad de PBS agregado
RHDV-1m	1.0110 g 1.0108 g 1.0110 g	1.0130 g	0.0018 g	0.9 ml
RHDV-2m	1.0043g 1.0043 g 1.0042 g	1.0042 g	0.0009 g	0.45 ml
RHDV-3m	1.0135 g 1.0131 g 1.0130 g	1.0123 g	0.0022 g	1.1 ml
RHDV-4m	1.0245 g 1.0240 g 1.0240 g	1.0241 g	0.0032 g	1.6 ml
RHDV-5m	1.0124 g 1.0123 g 1.0122 g	1.0123 g	0.0022 g	1.1 ml
RHDV-6m	1.0125 g 1.0124 g 1.0126 g	1.0125 g	0.0019 g	0.95 ml

En el (Cuadro 2) se referencian los pesajes de los tubos vacíos y los promedios de cada pesaje, así como el peso de cada péptido y la cantidad de PBS estéril agreda, checar anexos para la elaboración del PBS.

Para calcular la cantidad de PBS requerida idónea que servirá para ajustar la concentración de 2 mg/ml se realizó una regla de 3, usando el valor de cada pesaje de cada péptido y la concentración deseado de 2 mg/ml como se muestra en el (Cuadro 3).

Operaciones

Cuadro 3 Operaciones para calcular el PBS necesario para la concentración requerida

$RHDV - 1m \ 1.8 \ mg \left(\frac{1 \ ml}{2 \ mg} \right) = 0.9 \ ml$	$RHDV - 2m \ 0.9 \ mg \left(\frac{1 \ ml}{2 \ mg} \right) = 0.45 \ ml$
$RHDV - 3m \ 2.2 \ mg \left(\frac{1 \ ml}{2 \ mg} \right) = 1.1 \ ml$	$RHDV - 4m \ 3.2 \ mg \left(\frac{1 \ ml}{2 \ mg} \right) = 1.6 \ ml$
$RHDV - 5m \ 2.2 \ mg \left(\frac{1 \ ml}{2 \ mg} \right) = 1.1 \ ml$	$RHDV - 6m \ 1.9 \ mg \left(\frac{1 \ ml}{2 \ mg} \right) = 0.95 \ ml$

Para colocar la cantidad requerida de PBS estéril, se usó una micropipeta de 100 a 1000 µl, una vez colocado el PBS se vortexeó por 30s para homogenizar de forma mecánica. Tras realizar este procedimiento, solo el péptido RHDV-2m se solubilizó correctamente, el resto no lo hizo y se optó por calentarlos en baño maría para

solubilizarlos, iniciando con una temperatura de 37°C por periodos de 5 a 15 minutos, alternando entre el calentado y el votex, esperando la completa homogenización. Con este proceso no se lograron homogenizar correctamente los péptidos restantes.



Figura 15 Sonicación de los Péptidos

Al observar que no se homogenizaron se aumentó la temperatura gradual mente hasta un máximo de 45°C, después de realizar esto y al observar que los péptidos no se homogenizaban, se optó por sonicar cada péptido restante, como se muestra en la (Figura 15).

Cuadro 4 Conejos por grupos y volúmenes por inmunización

No. conejo	Péptido	Volumen de la formula por dosis
1	1	1 ml x dosis
2	1	1 ml x dosis
3	2	1 ml x dosis
4	2	1 ml x dosis
5	3	1 ml x dosis
6	3	1 ml x dosis
7	4	1 ml x dosis
8	4	1 ml x dosis
9	5	1 ml x dosis
10	5	1 ml x dosis
11	6	1 ml x dosis
12	6	1 ml x dosis
13	control	1 ml x dosis
14	control	1 ml x dosis

Se usó hielo para enfriar la solución durante todo el proceso y con esta metodología se lograron solubilizar los péptidos, cada péptido se rotulo e identificó de acuerdo al (Cuadro 2).

El total se inmunizaron 14 conejos, 2 individuos por péptido, y se inmunizaron 3 veces, por lo que se prepararon formulaciones, una por péptido más la formulación que contenía solo PBS y adyuvante (control), con un volumen total de 10 ml cada una, como se muestra en el (Cuadro 4).

Con los péptidos solubilizados se procedió con la elaboración de las vacunas, como ya se describió anteriormente se usaron un total de 14 individuos dentro del experimento es decir un total de 10 ml a preparar de cada vacuna con péptido como se observa en el (Cuadro 5).

Estas vacunas se realizaron a una concentración de 70% adyuvante y 30% de péptidos homogenizado en PBS estéril. A un volumen final de 1 ml por dosis.

Considerando todo esto:

- 70 % adyuvante (montanide ISA 71)
- 15% antígeno (péptido previamente diluido en PBS estéril)
- 15% PBS estéril

En el (Cuadro 5) se muestra la cantidad de cada elemento a usar para la elaboración de cada vacuna.

Cuadro 5 Cantidades de Péptido, PBS y montanide por vacuna

	µl	ml	Control ml	Vacunas Péptidos ml
Montanide ISA 71	7000	7	7	7
Péptidos diluido	500	0.5	0	0.5
PBS estéril	2500	2.5	3	2.5
total	10 000	10	10	10

Para el inicio de la elaboración de la vacuna, se limpió y desinfecto la cabina de bioseguridad nivel 2 en la que se trabajó con etanol al 70% y toallas de papel absorbente.

Se limpió y desinfecto el homogeneizador con etanol al 70% antes de ingresarlo a la cabina, una vez dentro se monta al rotor y se dejó en solución de benzal al 10% por 10 minutos (Figura 17).



Figura 16 Material dentro de cabina de bioseguridad estéril

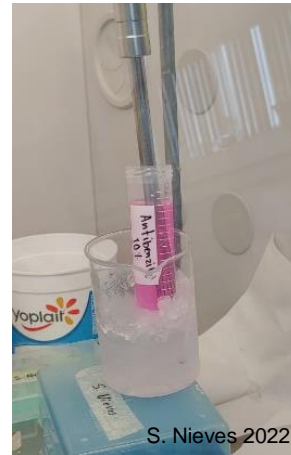


Figura 17 Colocación del homogenizado en Benzal

Se usaron estos 10 minutos para separar PBS estéril, montanide ISA 71 y agua estéril en tubos cónicos de 15 ml estériles para evitar contaminar todo el stock de material que se usó y se reservaron los péptidos, todo este proceso se realizó dentro de la cabina de bioseguridad como se observa en la (Figura 17).

Después de los 10 minutos se procedió a enjuagar con agua estéril, primero se realizó la dosis del grupo control para esta se procedió a colocar 3 ml de adyuvante en un tubo de 50 ml y homogenizamos, como se muestra en la (Figura 18), dando un ciclo de 3 minutos, después de este tiempo se agregan 2 ml más y se vuelve a dar un ciclo de 3 minutos, una vez terminado se agregan los últimos 2 ml para llegar al total de 7 ml requeridos revisar (Cuadro 5).

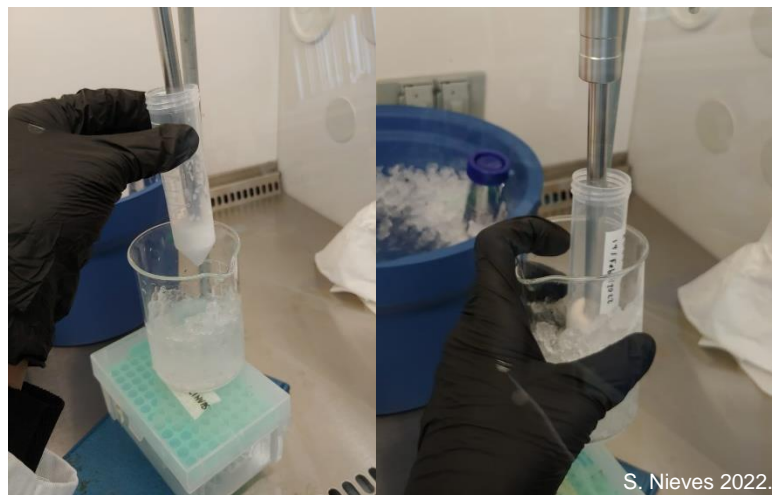


Figura 18 Proceso de elaboración de las vacunas. Fotografía tomada por S. Nieves 2022.

En todo este proceso se mantuvo frío el adyuvante, colocándolo en un vaso de precipitado con hielos.

Terminada esta parte se inicia con la incorporación del PBS estéril, agregando 1 ml con un ciclo de 3 minutos, repitiendo el proceso hasta llegar al volumen de 10 ml y al finalizar se dio un último ciclo de 10 minutos corridos, para incorporar todo muy bien, terminando esto se toma una pequeña muestra y se observan las micelas al microscopio con el objetivo de 100 x con aceite de inmersión (Figurar 19).

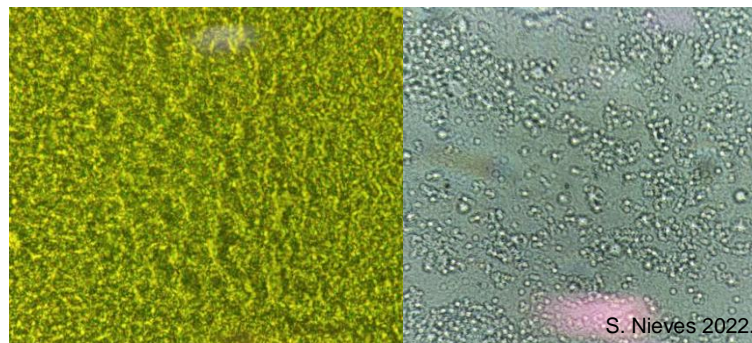


Figura 19 Micelas observadas al microscopio.

Una vez terminado se limpió el homogeneizador con etanol y agua estéril para dejarlo y se colocó otros 10 minutos en benzal, para limpiarla y eliminar restos de la vacuna previamente elaborada y evitar contaminar las siguientes vacunas, esto se repitió entre cada vacuna elaborada.

La metodología descrita en los párrafos anteriores, fue utilizada para la formulación del resto de vacunas. A diferencia del anterior, se añadió el péptido inmunogénico disuelto en solución amortiguadora de fosfatos estéril, cambiando la proporción como se muestra en el (Cuadro 5). La emulsificación de la mezcla adyuvante/péptido se realizó añadiendo la fase acuosa (péptido) a la fase oleosa (adyuvante) de manera lenta y progresiva con ciclos de pulsos por 3 minutos. El tamaño de las micelas fue confirmado por microscopía y las dosis fueron rotuladas para su correcta identificación (Cuadro 1). Para la elaboración de cada vacuna el equipo fue limpiado y desinfectado con benzal 10% por 10 minutos.

Las vacunas se protegieron de la luz envolviendo los tubos en aluminio y colocándolas a 4 °C, antes de usarse se observaron las micelas al microscopio, en caso de observarse separación previa a las inmunizaciones se mezclaron en vortex y se usaron, siempre se transportaron en refrigeración y protegidas de la luz.

5.5 Método para la Inmunización y el muestreo de los conejos:

Los conejos usados en este experimento son de la raza Nueva Zelanda, de 8 semanas de edad, se realizaron un total de 4 muestreos y 3 inmunizaciones, la primera toma de muestra se realizó 7 días antes de la primera inmunización tomando muestras antes de cada inmunización y después de la última inmunización como se muestra en el (Cuadro 6).

Cuadro 6 Fechas de muestreos e inmunizaciones

FECHA	ACTIVIDAD	Día
10/Feb/22	1ra Toma pre inmunización	- 7
16/Feb/22	Primera inmunización	0
09/Mar/22	Segunda toma de muestra post inmunización y segunda inmunización	21
30/Mar/22	Tercera toma de muestra post inmunización y Tercera inmunización	42
08/Abr/22	Ultima toma de muestras	51

Para la extracción de sangre se inmovilizaron los animales mediante un cajón de contención (Figura 20), si no se cuenta con estos se puede envolver en alguna tela para evitar su movimiento, sin embargo, con la tela se requiere de una persona que sujete al animal y otra para tomar la muestra de sangre (Figura 21).



*Figura 21 Cajón de contención
Fotografía tomada por S. Nieves 2022.*



*Figura 20 Contención con trapo
Fotografía tomada por S. Nieves 2022.*

La extracción de sangre se realizó de la arteria central auricular o venas marginales de la oreja (Figura 22). Previó a la extracción se desinfectó la zona con alcohol etanol al 70 %. Es muy importante respetar el volumen especificado en el tubo utilizado.



*Figura 22 Toma de muestra de arteria auricular
Fotografía tomada por S. Nieves 2022.*

Se dejaron las muestras a temperatura ambiente durante media hora o una hora antes de refrigerar. La refrigeración (4°C-8°C) puede hacerse en nevera, utilizando bloques de gel, debemos mantener seguros nuestras muestras durante el transporte al laboratorio para realizar la separación del suero.

En el laboratorio, las muestras se centrifugaron por 10 minutos a 3500 rpm, después de esto, dentro de una cabina de bioseguridad previamente limpiada y desinfectada y se procedió a separar el suero del paquete celular, con ayuda de micropipetas limpias y desinfectadas y con puntas estériles. El suero se colocó en tubos de 1.5 ml y se alicuotó una porción en un tubo de 200 µl, estas se usaron para las pruebas necesaria evitando así descongelar el volumen más grande y evitando la degradación de todo el suero.

Una vez separado el suero en tubos de 1.5 ml y 200 µl debidamente rotulados como se muestra en el Cuadro 4 deben guardarse en refrigeración a -4°C y únicamente se descongelaron para realizar las pruebas de ELISA correspondientes.

Este procedimiento se realizó para cada muestreo mostrado en el Cuadro 6 con un total de 4 muestreos realizado a cada conejo.

Las vacunas se transportaron en hielera, protegidas de la luz y se mantuvieron refrigeradas, antes de salir del laboratorio se revisaron al microscopio cada una, y se cargaron las jeringas con la cantidad requerida 2 ml por vacuna, para cada muestreo, se llenaron 7 jeringas con 2 ml de vacuna según correspondiera el péptido y el control y se identificaron como se muestra en el Cuadro 2, así mismo se llevaron agujas nuevas y selladas calibre 22G para no usar la misma aguja en los animales.

Los conejos se sujetaron con trapos para evitar que se movieran y para mantenerlos tranquilos, la zona donde se aplicó cada vacuna fue en la región del cuello, alternando entre lado izquierdo y derecho en cada inmunización.

Se limpió la zona y se procedió a desinfectar usando torundas con alcohol al 70% haciendo a un lado el pelo para poder observar la piel.

Sujetamos y levanto la piel para que se formó un triángulo, después se insertó la aguja con el bisel hacia arriba de forma subcutánea sin llegar al musculo, y se inyecta la vacuna, como estas vacunas son oleosas, se debe inocular firme pero despacio.

Una vez inoculada la vacuna se dio un suave masaje con una torunda limpia en la zona y se observa que toda la vacuna quedo dentro de la piel.

5.6 Método para Elaboración de ELISAs

5.6.1 Titulación de los Péptidos:

Primero se realizaron las titulaciones de cada péptido, de anticuerpos primarios y del anticuerpo secundario anti-conejo IgG H + L HRP, para encontrar las concentraciones ideales de cada uno y con estos datos poder realizar las evaluaciones de la inmunogenicidad de cada conejo según corresponda a las inmunizaciones señaladas en el Cuadro 6 y también se realizaron estas mismas pruebas usando la proteína VP60.

Para la titulación del cada péptido, se realizaron ELISA indirecta, haciendo diluciones seriadas para encontrar la concentración ideal.

- 5.6.1.1 Se inició sensibilizando las placas, diluyendo cada péptido en solución amortiguadora de carbonatos, a una concentración de 1 µg/ml para los péptidos (2, 3, 4, 5 y 6) y 8 µg/ml para péptido 1, de los cuales se realizó una dilución seriada de 7 pasos. Se usaron placas de ELISA de 96 pozos, una para 2 péptido, colocamos 100 µl de buffer de carbonatos iniciando desde el poso B1 al B12 y del B1 al G12, en los pozos del A1 al A12 colocaremos 200 µl de los péptidos, previamente

diluido como se muestra en la (Figura 23), siendo para el péptido 2 del A1 al A 6 y del A7 al A12 para el péptido 4.

5.6.1.2 Diluciones seriadas, una vez que se colocaron los 100 μl en los pozos indicados y los 200 μl de péptido diluido en buffer de carbonatos donde se indicó, ver la (Figura 23), con ayuda de la micropipeta multicanal y tomaron 100 μl de los pozos iniciales que tenían los 200 μl , que son los pozos del A1 hasta el A6 para el péptido 2 y del pozo A7 hasta el A12 para el péptido 4 como se ve en la (Figura 23). Se regresaron y tomaron 3 veces más para homogenizar bien la muestra (pipeteos), después se depositarán los 100 μl en las siguientes hileras de pozos del B1 al B12, realizando el mismo procedimiento de pipeteo, se continuó hasta llegar a los pozos del G1 al G12, Terminando desechamos los 100 μl que quedaran en la micropipeta y repetimos este procedimiento con todos los péptidos.

5.6.1.3 Para los controles; al control negativo y positivo se le colocaron 100 μl de péptido con concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, mientras que al control del conjugado se le colocó 100 μl de solución de buffer de carbonatos con anticuerpo positivo tomado de conejos inmunizados con la proteína VP60 que dieron positivo (ultima inmunización) en una concentración 1:500, todas las diluciones tanto de péptido y controles se realizaron por triplicado.

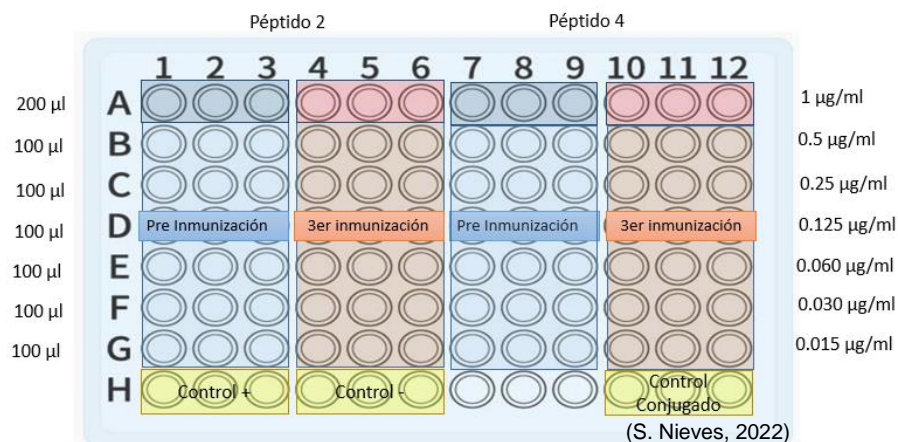


Figura 23 Distribución del péptido 2 y 4 para realizar las diluciones seriadas

5.6.1.4 Terminado este proceso, se cubrieron con plástico Film transparente, y se colocaron a una temperatura de 4°C por toda la noche para la sensibilización de cada placa.

- 5.6.1.5 Pasado este tiempo se descartó la solución de todos los pozos y se realizaron 3 lavados con PBS-t, se añadió 200 µl de PBS-t en todos los pozos, para hacerlo más rápido se usó una micropipeta multicanal, una vez llenos los 96 pozo, se sostuvo la palca por los bordes en posición horizontal con la mano dominante y se golpeó suavemente el borde de la placa contra la palma de la mano que se encuentra libre por 30 segundos, procurando que la solución no salga de su respectivo pozo, después se descartó la solución de los pozos de la placa y se secó extendiendo un pliego de tela absorbente sobre una mesa, sosteniendo firme mente la placa con los pozos hacia abajo y golpeando firmemente la placa contra la tela hasta que los pozos queden visiblemente secos, esto se repite 3 veces, hasta aquí es el procedimiento de lavado que se realizó cada que se indique “Realizar los lavados”.
- 5.6.1.6 Después se bloquearon las placas con una solución de bloqueo, compuesta por PBS-t con leche descremada en polvo al 5 %, se colocaron 200 µl de solución de bloqueo a cada pozo, se envolvió con plástico film y se incubó a 37°C por 1 hora en agitación orbital 200 RPM.

Pasada la hora se realizan 3 lavados, repitiendo el procedimiento de lavado ya descrito en el paso 5.6.5.

- 5.6.1.7 Terminando la hora se continuó con la preparación de los anticuerpos primarios (sueros de los animales inmunizados con los péptidos), para la titulación de los péptidos usamos suero pre-inmune y suero de la 3er inmunización, con una concentración de 1:500, en PBS-t con leche al 2%, esto en función del volumen total requerido lo que será 2.5 ml por suero. Colocando 100 µl de anticuerpo primario 1:500 diluido en PBS-t en cada pozo, correspondiente al péptido con él que se sensibilizo la placa, por eso es importante identificar bien las placas y las posiciones como se esquematizó en la Figura 24. Para los controles; el control del conjugado y negativo, llevan únicamente solución de PBS-t con leche al 2% y el control positivo lleva suero de un animal positivo a la vacuna (se usó suero positivo de animales inmunizados con la proteína VP60).

Se seleccionó un suero al azar entre los 2 animales por grupo uno pre inmunización y uno de 3er inmunización como se observa en la (Figura 24 y el Cuadro 4).

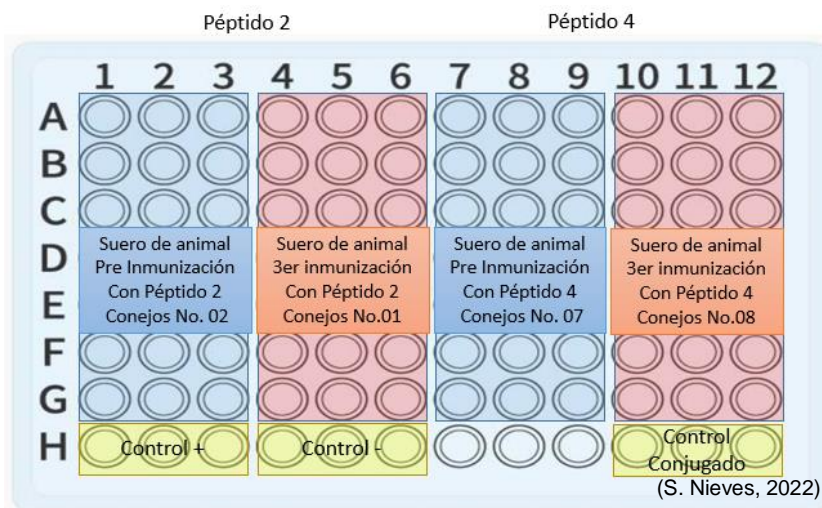


Figura 24 Distribución de anticuerpo primario de los péptidos 2 y 4

5.6.1.8 Una vez colocados los 100 µl de anticuerpo primario 1:500 según corresponda ver (Figura 24), se envolvió con papel film y se incubo a 37°C por 1 hora en agitación orbital 200 RPM (incubación del anticuerpo primario).

Una vez transcurrida una hora se repiten los 3 lavados paso 5.6.5

5.6.1.9 Después se colocó el anticuerpo secundario anti-conejo IgG H + L HRP el cual previamente se tituló manejando un procedimiento similar al que se está describiendo, el cual tendrá una concentración de 1:4000 el cual se diluyo en PBS-t con leche al 2%, del cual se colocarán 100 µl en cada uno de los 96 pozos sin importar si son controle y se incubara nuevamente a 37°C por 1 hora en agitación orbital 200 RPM (incubación del anticuerpo secundario).

Después de transcurrir una hora se realizan los últimos 3 lavados paso 5.6.5

5.6.1.10 Terminado el tiempo se preparó la solución de revelado, para una placa de ELISA se prepara (Citrato de sodio a 1 Molar 5ml, ácido cítrico a 1 Molar 5ml, OPD 8mg y H2O2 8 µl), Una vez preparada tenemos que colocar 100 µl, en cada pozo, iniciando el llenado hay que tomar tiempo con cronometro, porque debemos hacer 3 lecturas la primera a los 15 minutos de haber colocado la solución, a los 20 y 25 minutos la última, una vez terminado el llenado protegeremos de la luz nuestra placa usando una cubierta del mismo empaque de las ELISA forrada con papel aluminio.

5.6.1.11 Para la lectura de la placa usamos la siguiente configuración en el lector; filtro de 450/off; modo: normal; shake: on; speed: slow; time: 00:00: 02 s y layout: 96 wells.

Terminando la lectura y obteniendo nuestros datos en Microsoft Excel realizamos los análisis estadísticos y las gráficas correspondientes para determinar las concentraciones de cada péptido ya que las necesitamos posterior mente, realizamos una prueba T de Student comparando las absorbancias de los pozos pre inmunización comparados con los de la 3er inmunización.

Los resultados nos indicaron que para los Péptidos 2, 3, 4, 5 y 6 la concentración de péptido adecuada a utilizar en las pruebas de 1 $\mu\text{g/ml}$ y para el péptido 1 de 8 $\mu\text{g/ml}$, estos fueron tomados a los 20 minutos como se muestra en el Cuadro 7, estas concentraciones fueron las usadas en las titulaciones de los anticuerpos primarios, no se encontraron anticuerpos específicos para el péptido 3, por lo que para comprobar y tratar de estandarizar las titulaciones se probó con sueros de animales inmunizados con la proteína quimérica VP60, los resultados de estas pruebas se encuentran en el apartado de resultados de este trabajo.

5.6.2 Titulación de anticuerpo primario:

Se sensibilizaron las placas con la concentración correspondiente a cada péptido como se observa en el Cuadro 7 colocando 100 μl de péptido diluido en buffer de carbonatos como se muestra en la Figura 25, según corresponda el péptido, para esta prueba se usó una placa por péptido y se colocaron los controles como se describe en el paso 5.6.3 y se cubrió y dejó en refrigeración como se indica en el paso 5.6.4.

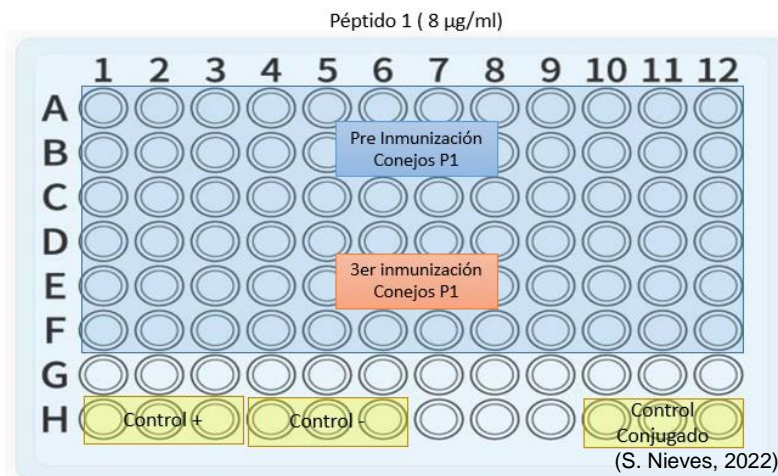


Figura 25 Sensibilizado de la placa para el péptido 1

Terminado el tiempo requerido se desechó la solución, se realizaron 3 lavados como se describen en el paso 5.6.5 y se bloqueó como se indica en el paso 5.6.7. Trascurrida la hora se repitieron los 3 lavados y se procedió con la dilución de los anticuerpos primarios (Sueros de conejos inmunizados con los péptidos), para los cuales se realizaron una dilución seriada de 12 pasos parecida a la descrita en el paso 5.6.2. Estas diluciones se realizaron en sentido horizontal en las placas como se muestra en la Figura 26, empezando con una concentración de 1:500 y se incubó como se describe en el paso 5.6.8.

Terminada la hora y después de realizar los lavados descritos en el paso 5.6.5 se preparó el anticuerpo secundario como se describe en el paso 5.6.9 colocando 100 µl del anticuerpo secundario e incubando como se describe en el paso 5.6.9. Se repitieron los 3 lavados y se procedió a preparar la solución de revelado como se describe en el paso 5.6.10 y las lecturas como se describe en el paso 5.6.11.

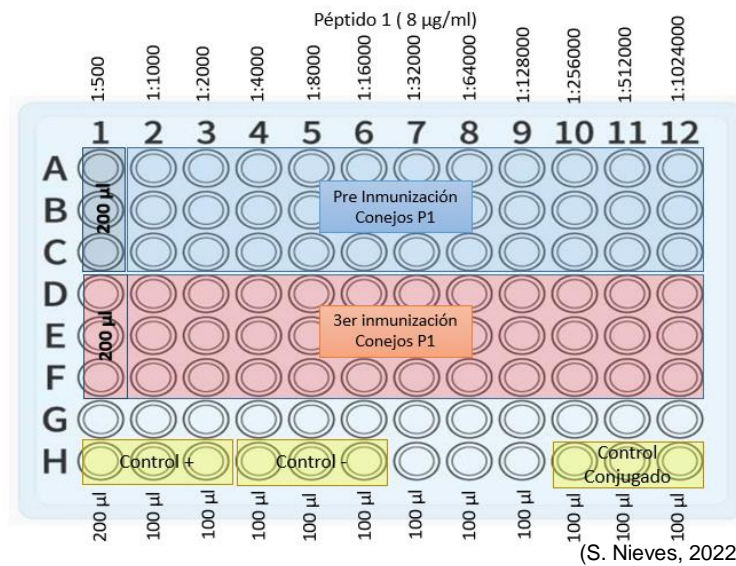


Figura 26 Distribución y dilución seriada para titulación de anticuerpo primario péptido 1

Tras la lectura de la placa, los resultados analizados estadísticamente fueron los del tiempo de 20 minutos. Como se muestra en el Cuadro 7 se optó por utilizar la concentración 1:500 para determinar la generación de anticuerpos en cada inmunización. Los sueros de los conejos inmunizados con el péptido 3 no generaron respuesta, para comprobar y tratar de estandarizar las titulaciones se probó con sueros de animales inmunizados con la proteína VP60, los resultados de estas pruebas se encuentran en el apartado de resultados de este trabajo.

5.6.2 Evaluación de la inmunogenicidad contra cada péptido:

Con los datos obtenidos de las titulaciones, unas para la concentración del péptido y otras para la concentración del anticuerpo primario se procedió a evaluar la inmunogenicidad de cada una de las inmunizaciones, como se menciona anteriormente, la concentración de anticuerpo primario utilizada fue de 1:500 para todos los sueros y de péptido la descrita en el cuadro 7. La concentración de la proteína VP60 fue de 2 µg/ml, la cual fue determinada previamente en otro trabajo realizado por M. Rocha (2022), las concentraciones se observan en el Cuadro 8.

Cuadro 7 Datos de las concentraciones de cada péptido

Vacuna	Concentración de Péptido	Concentración de Anticuerpo primario	Concentración de Anticuerpo secundario
RHDV-1m	8 µg/ml	1:500	1:4000
RHDV-2m	1 µg/ml	1:500	1:4000
RHDV-3m	1 µg/ml	1:500	1:4000
RHDV-4m	1 µg/ml	1:500	1:4000
RHDV-5m	1 µg/ml	1:500	1:4000
RHDV-6m	1 µg/ml	1:500	1:4000

Cuadro 8 Datos de las concentraciones de la proteína para cada péptido

Vacuna	Concentración de Proteína VP60	Concentración de Anticuerpo primario	Concentración de Anticuerpo secundario
RHDV-1m	2 µg/ml	1:500	1:4000
RHDV-2m	2 µg/ml	1:500	1:4000
RHDV-3m	2 µg/ml	1:500	1:4000
RHDV-4m	2 µg/ml	1:500	1:4000
RHDV-5m	2 µg/ml	1:500	1:4000
RHDV-6m	2 µg/ml	1:500	1:4000

Con estos datos se realizó la evaluación de la inmunogenicidad contra los péptidos RHDV-1m, RHDV-2m, RHDV-3m, RHDV-4m, RHDV-5m, RHDV-6m así mismo se evaluó si los anticuerpos generados por cada péptido tienen la capacidad de reconocer a la proteína VP60 mediante una prueba de ELISA indirecta.

Para evaluar la inmunogenicidad se inició sensibilizando las placas de ELISA con cada péptido y con la proteína usando las concentraciones mostradas en los Cuadros 7 y 8.

Los péptidos y la proteína se diluyeron en buffer de carbonatos y se colocaron 100 µl en las siguientes distribuciones observada en las Figuras 27 y 28, se colocaron también los controles como se describe en el paso 5.6.3.

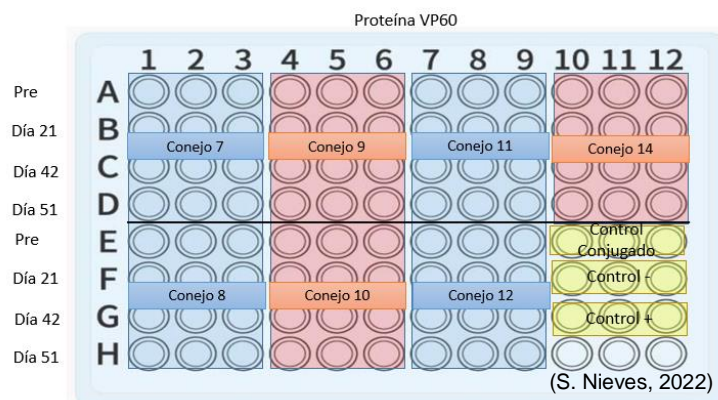


Figura 27 distribución de la placa sensibilizada con la proteína VP60 y colocación de los sueros de los conejos inmunizados con los péptidos 4,5, 6 y un control

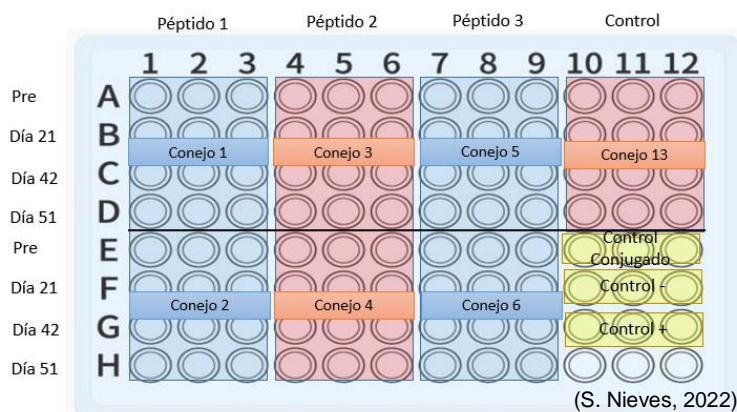


Figura 28 Distribución de la placa sensibilizada con los péptidos 1,2, 3 y colocación de los sueros de los conejos inmunizados con los péptidos 1,2,3 y control

Se repitió el procedimiento ya descrito anterior mente para sensibilizar las placas, Se colocó el péptido y la proteína diluidos en buffer de carbonatos de acuerdo al procedimiento del paso 5.6.5, pasado el tiempo de sensibilizado se desechó la solución y se realizaron 3 lavados descritos en el paso 5.6.5 y se procedió a bloquear las placas como se describe en el paso 5.6.7. Finalizado este paso se realizaron 3 lavados más y se diluyó el anticuerpo primario (sueros de conejos inmunizados con los péptidos), colocando 100 µl por pozo. Se usaron los sueros de los 14 animales y sus 4 muestreos, usando las distribuciones mostradas en las Figuras 27 y 28, sin olvidar colocar los controles de acuerdo al paso 5.6.3.

Se cubrieron las placas con papel film transparente e incubaron como se muestra en el paso 5.6.8. Cuando se terminó la hora de incubación, se desechó la solución y se realizaron los 3 lavados, después se colocó el anticuerpo secundario anti-conejo IgG H + L HRP, el cual se incubo de acuerdo al paso 5.6.9 y se repitieron los 3

lavados. Posteriormente se preparó la solución de revelado como se describe en el paso 5.6.10, y también las lecturas como se describe en el paso 5.6.11.

El análisis de la producción de anticuerpos específicos contra cada péptido perteneciente a la proteína quimérica se realizó mediante un ensayo de ELISA indirecta e indicó la presencia de anticuerpos específicos en los animales inmunizados con cada péptido evaluado y ausencia de anticuerpos en los grupos control (Cuadro 4, Conejos por grupos y volúmenes por inmunización).

Todos los análisis estadísticos para cada titulación de anticuerpos específicos y la evaluación de la inmunogenicidad se realizaron mediante pruebas de T de Student y ANOVA, con intervalo de confianza del 95% ($P < 0.05$).

VI Resultados y Discusión

Las pruebas revelaron la siguiente información.

6.1 Resultados de la determinación de la dilución del Anti-Conejo IgG H + L HRP

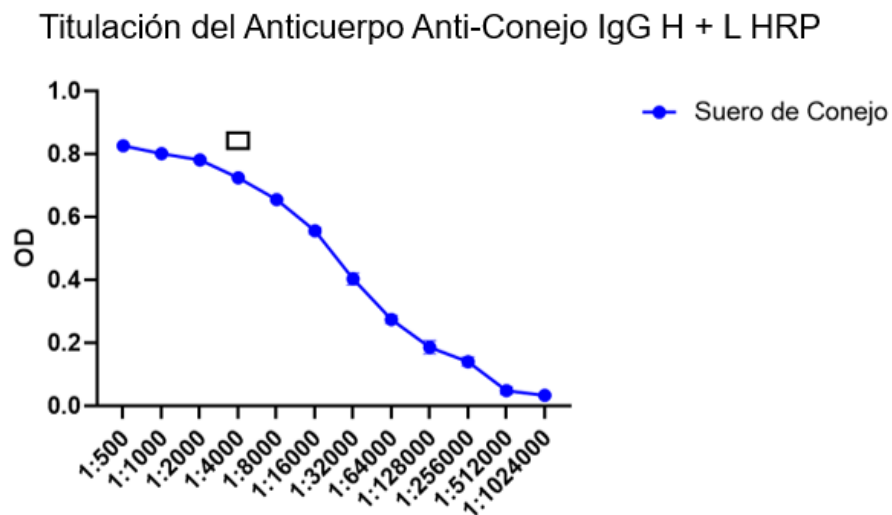


Figura 29 Titulación del anticuerpo anti-conejo IgG H+L HRP.

La concentración 1:4000 fue la seleccionada para utilizarse en los experimentos posteriores.

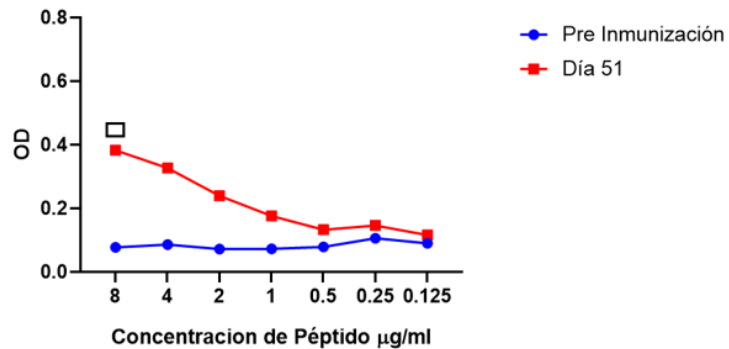
□ indican diferencia estadística significativa entre las diluciones evaluadas ($P < 0.05$).

Como se muestra en la Figura 29 según la prueba estadística aplicada, la concentración 1:4000 del Ac. secundario fue la que mostraba tener mejor resultado en densidad óptica con menor concentración, demostrando que tiene diferencia estadísticamente significativa comparada con la dilución siguiente pero no la dilución anterior. Según el libro *The ELISA* (Crowther, 2009), la dilución de antígeno a utilizar es mínima que dé resultados similares a la máxima que para este caso sería 1:4000 pues tiene suficiente antígeno para considerarse óptimas (Crowther, 2009). Sin embargo, para la estandarización de las titulaciones el protocolo que se usó toma las OD de 0.4 como ideales por esta razón en la mayoría de las pruebas se

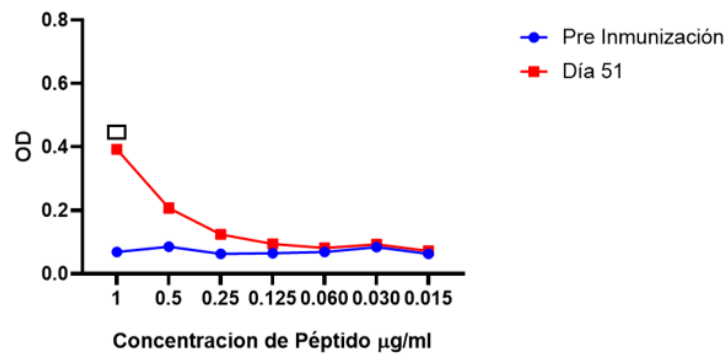
tomaron de referencia los análisis estadísticos y los valores más cercanos a 0.4 para la estandarización de cada prueba realizada. a continuación, se muestran los resultados de todas estas pruebas.

6.2 Resultados de la Titulación de cada Péptido.

A) Titulación de la Concentración del Péptido 1



B) Titulación de la Concentración del Péptido 2



C) Titulación de la Concentración del Péptido 3

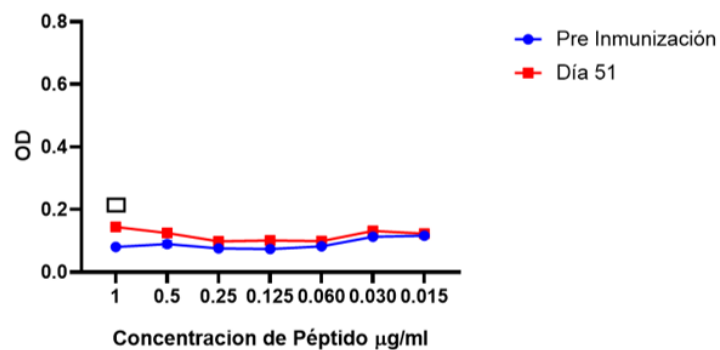
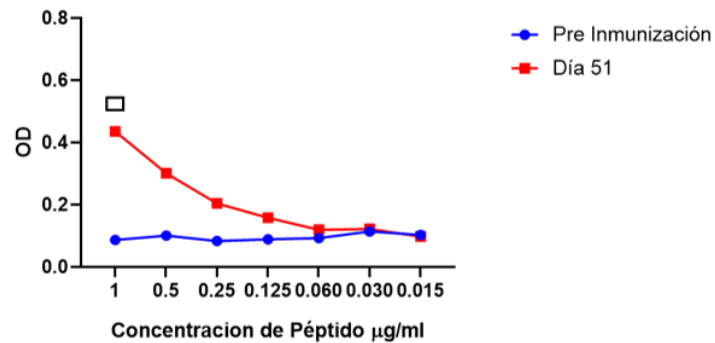


Figura 30 Titulación de la concentración de los péptidos 1, 2 y 3.

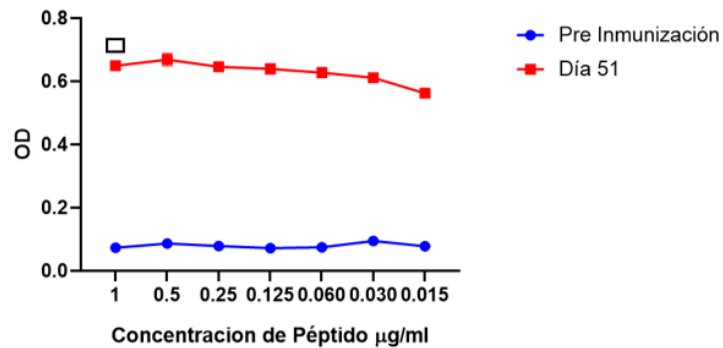
A) titulación del péptido 1. B) titulación del péptido 2. C) titulación del péptido 3. Las concentraciones de 8 µg/ml para el péptido 1 y 1 µg/ml para el péptido 2 y 3 fueron las seleccionadas para utilizarse en los experimentos posteriores. □ indican diferencia estadística significativa entre concentraciones pre y post inmunización ($P < 0.05$).

Como se muestra en la figura 30, de acuerdo a los análisis estadísticos realizados se observa que las densidades ópticas sugerentes a las concentraciones con diferencia estadísticamente significativa comparada entre cada concentración evaluada pre y post inmunización fue de 8 µg/ml para el péptido 1 y para los péptidos 2 y 3 fue de 1 µg/ml, sin embargo, en el péptido 3 no se observa una densidad óptica similar a la obtenida en el resto de las pruebas, por esto se realizó una prueba extra a este péptido.

A) Titulación de la Concentración del Péptido 4



B) Titulación de la Concentración del Péptido 5



C) Titulación de la Concentración del Péptido 6

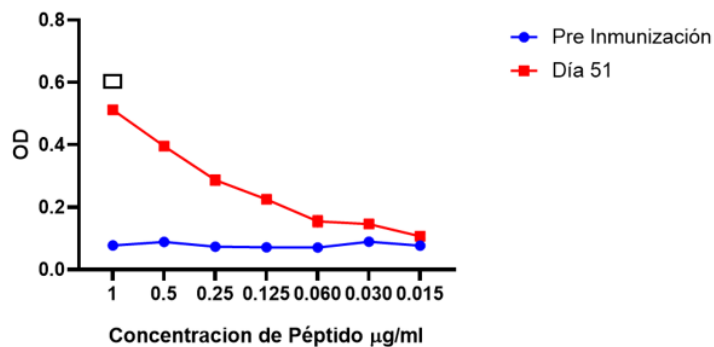
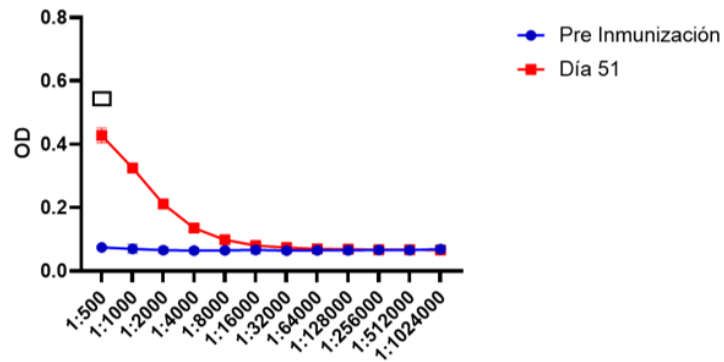


Figura 31 Titulación de la concentración de los péptidos 4, 5 y 6
 A) titulación del péptido 4. B) titulación del péptido 5. C) titulación del péptido 6. La concentración de 1 µg/ml fue la seleccionada para utilizarse en los experimentos posteriores. □ indican diferencia estadística significativa entre concentración pre y post inmunización ($P < 0.05$).

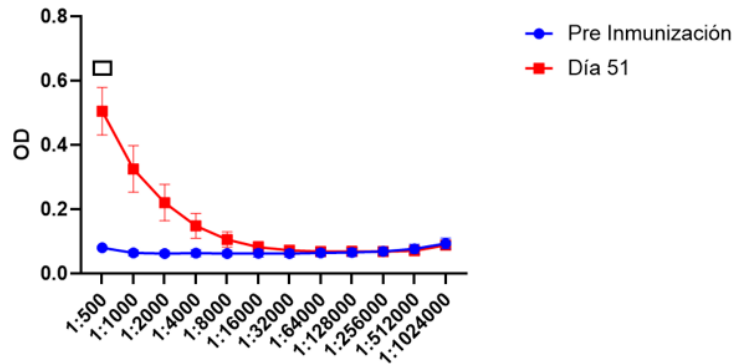
Como se observa en la figura 31, de acuerdo a los análisis estadísticos realizados, las concentraciones con diferencia estadísticamente significativa entre cada concentración evaluada de los sueros pre y post inmunización del péptido 4, 5 y 6 fue de 1 µg/ml.

6.3 Resultados de la Titulación del anticuerpo primario contra cada Péptidos

A) Titulación del Anticuerpo Contra el Péptido 1



B) Titulación del Anticuerpo Contra el Péptido 2



C) Titulación del Anticuerpo Contra el Péptido 3

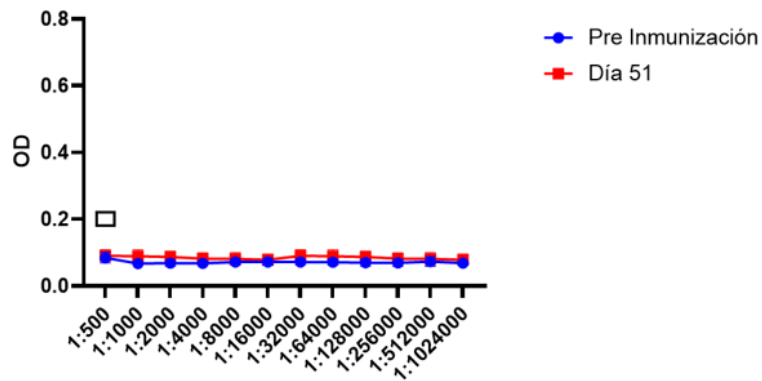


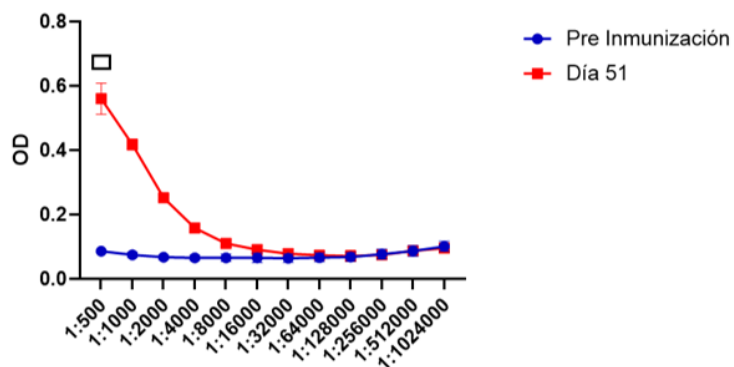
Figura 32 Titulación de la dilución del Ac primario contra el péptidos 1, 2 y 3.

A) titulación de la dilución del Ac primario contra el péptido 1. B) titulación de la dilución del Ac primario contra el péptido 2. C) titulación de la dilución del Ac primario contra el péptido 3. La dilución de 1:500 fue la seleccionada para utilizarse en los experimentos posteriores. □ indican diferencia estadística significativa entre diluciones pre y post inmunización ($P < 0.05$).

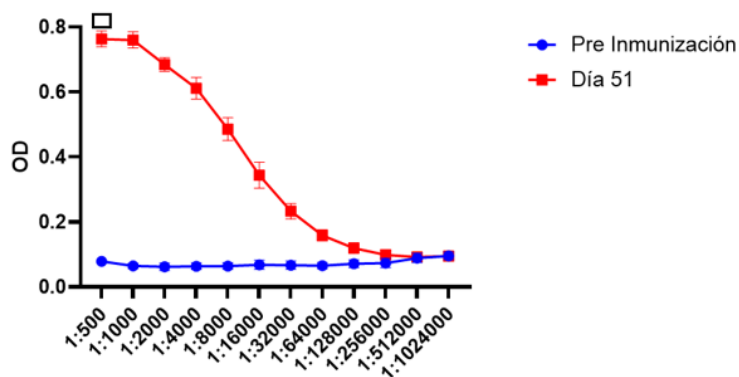
Como se muestra en la figura 32, de acuerdo a los análisis estadísticos realizados se observó que las diluciones con diferencia estadísticamente significativa entre cada dilución de los sueros pre y post inmunización fue 1:500, sin embargo, para el péptido 3 no se observa una densidad óptica similar a la obtenida en el resto de las pruebas, por esto se realizó una prueba extra a este péptido.

Recordemos que este péptido fue uno de los que no se solubilizo fácilmente y como nos explica (Salaikumaran, 2022) las proteínas menos solubles suelen ser más preocupantes ya que las proteínas sintéticas pueden no plegarse en una estructura correcta, y esto puede provocar que se pierda la actividad y la función de estas, se observa que se precipitan o forma cuerpos de inclusión, la solubilidad oscila entre 0 y 1,0, donde $>0,5$ indica solubilidad y $<0,5$ indica insolubilidad del péptido y esto pudo provocar que no se procesara y se presentara el péptido en las células presentadoras de antígeno.

A) Titulación del Anticuerpo Contra el Péptido 4



B) Titulación del Anticuerpo Contra el Péptido 5



C) Titulación del Anticuerpo Contra el Péptido 6

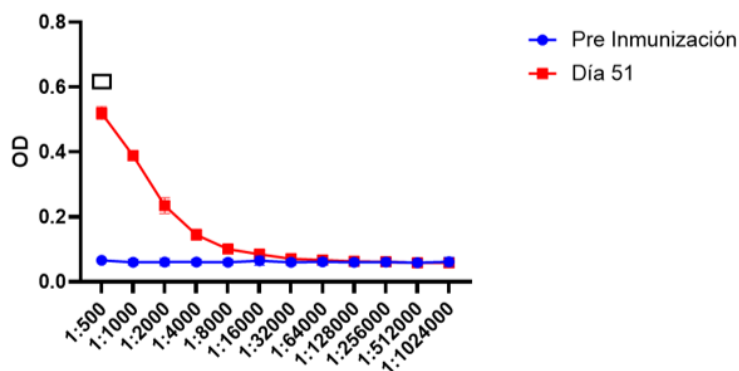


Figura 33 Titulación de la dilución del Ac primario contra el péptidos 4, 5 y 6.

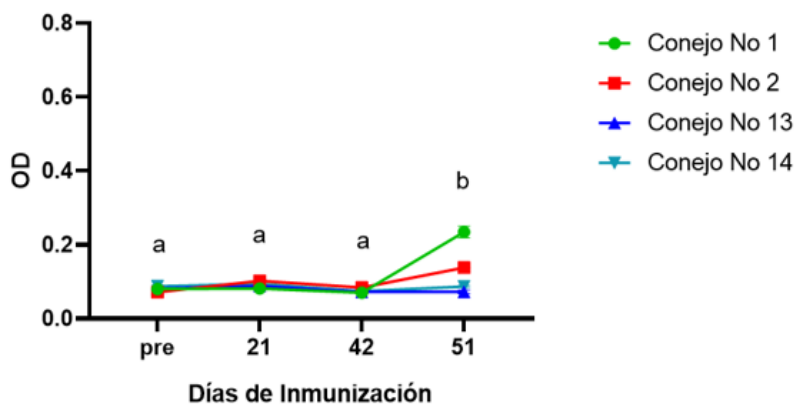
A) titulación de la dilución del Ac primario contra el péptido 4. B) titulación de la dilución del Ac primario contra el péptido 5. C) titulación de la dilución del Ac primario contra el péptido 6. La dilución de 1:500 fue la seleccionada para utilizarse en los experimentos posteriores. □ indican diferencia estadística significativa entre diluciones pre y post inmunización ($P < 0.05$).

Como se observamos en la figura 33, de acuerdo a los análisis estadísticos realizados las diluciones con diferencia estadísticamente significativa comparada entre los sueros pre y post inmunización del péptido 4, 5 y 6 fue de 1:500.

6.4 Resultados de la evaluación de la inmunogenicidad Contra cada Péptido y la proteína quimérica.

Los análisis de la producción de anticuerpos específicos tras la inmunización con cada péptido perteneciente a la proteína quimérica y el reconocimiento de la proteína quimérica por cada suero anti-péptido mostro los siguientes resultados:

A) Evaluación de la inmunogenicidad Contra el Péptido 1



B) Evaluación del Reconocimiento de la Proteína Recombinante por los Anticuerpos Anti Péptido 1

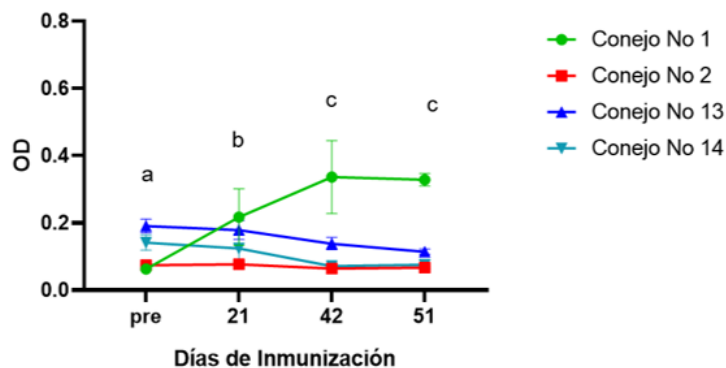


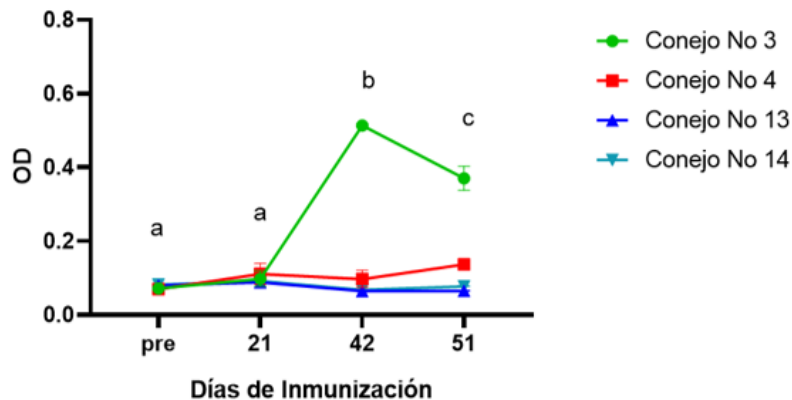
Figura 34 Evaluación de la Inmunogenicidad contra el péptido 1.

A) Evaluación de la inmunogenicidad contra el péptido 1. Y B) Evaluación del reconocimiento de la proteína recombinante por los Ac anti péptidos 1. ^{a,b,c} Letras diferentes indican diferencia estadística mente significativa entre cada inmunización ($P < 0.05$).

Como se muestra en la figura 34 inciso A, para el péptido 1 se muestra una generación de anticuerpos contra este péptido hasta el día 51 y existe un reconocimiento de los anticuerpos contra la proteína quimérica, a partir de día 42

tenemos un mayor reconocimiento comparado con el péptido individual figura 34-B. sin embargo, no observamos densidades ópticas altas para el conejo 2 en ninguna prueba por lo tanto este no genero anticuerpos, esto puede haber sido ocasionado por la presencia de diarreas y bajo peso en este conejo, sospechando de infección parasitaria de acuerdo a los signos clínicos observados, se realizó estudio coproparasitoscópico encontrando *ooquistes* de *Eimeria spp*, conocidas como *coccidias*. Los principales efectos del parásito son daño tisular, transformación de tejidos, interferencia mecánica (obstrucción), alteraciones nutricionales y trastornos inmunopatológicos (Herbosa, 2011), la alteración de la absorción de nutrientes y los daños tisulares, provocaran que el sistema inmune se enfoque en atacar a los parásitos y la falta de nutrientes se verá reflejada en diferentes funciones fisiológicas del organismo, entre ellas las funciones hormonales, de crecimiento y las propias inmunes como pueden ser la generación de anticuerpos.

A) Evaluación de la inmunogenicidad Contra el Péptido 2



B) Evaluación del Reconocimiento de la Proteína Recombinante por los Anticuerpos Anti Péptido 2

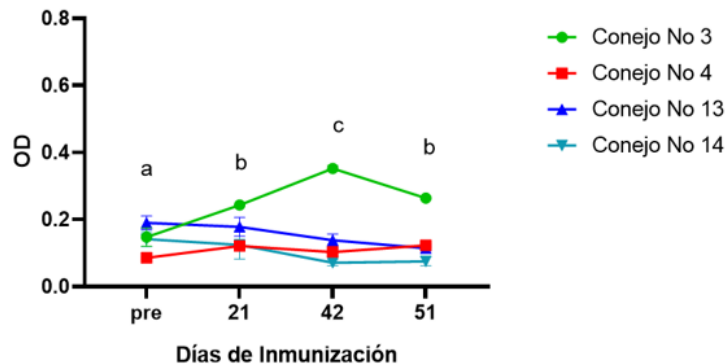
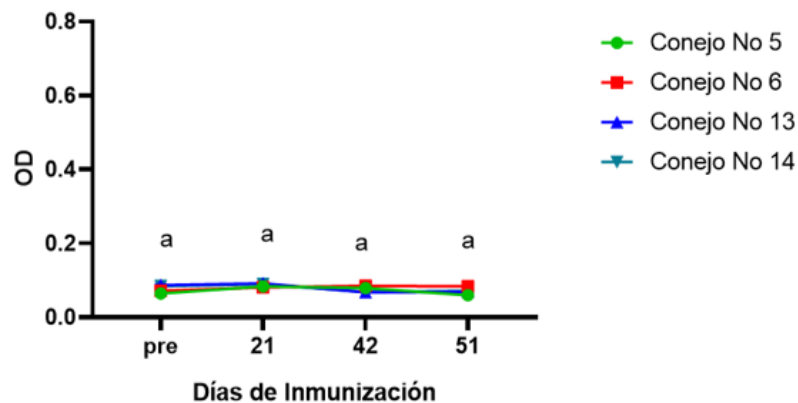


Figura 35 Evaluación de la Inmunogenicidad contra el péptido 2.

A) Evaluación de la inmunogenicidad contra el péptido 2. Y B) Evaluación del reconocimiento de la proteína recombinante por los Ac anti péptidos 2 ^{a,b,c} Letras diferentes indican diferencia estadística mente significativa entre cada inmunización (P<0.05).

Como se observan en la figura 35 Inciso A, para el péptido 2 vemos que tenemos una generación de anticuerpos contra este péptido hasta el día 42 y existe un reconocimiento de los anticuerpos contra la proteína quimérica, a partir del día 42 tenemos un reconocimiento mayor, pero este es menor en comparación con el péptido individual figura 35-B sin embargo, no observamos densidades ópticas altas para el conejo No. 4 en ninguna prueba por lo tanto este no generó anticuerpo, con este conejo paso lo mismo que el conejo No.2 este animal tenía bajo peso y presencia de diarreas y fue positivo a coccidias.

A) Evaluación de la inmunogenicidad Contra el Péptido 3



B) Evaluación del Reconocimiento de la Proteína Recombinante por los Anticuerpos Anti Péptido 3

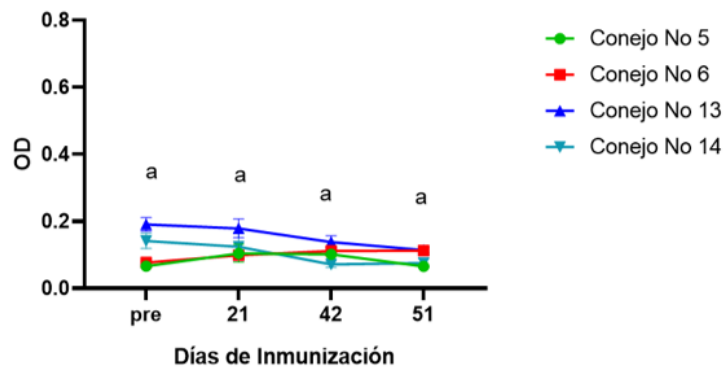


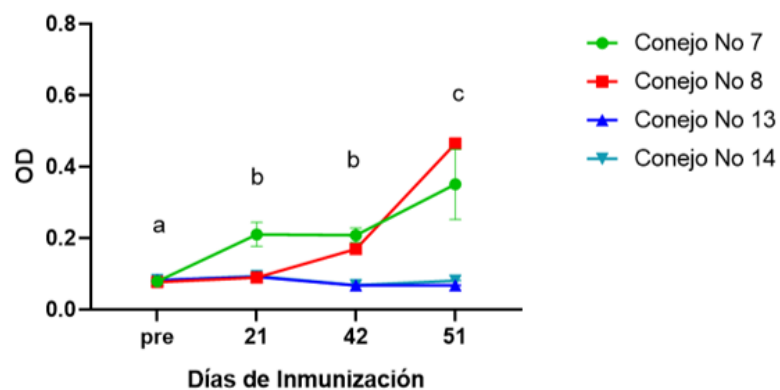
Figura 36 Evaluación de la Inmunogenicidad contra el péptido 3.

A) Evaluación de la inmunogenicidad contra el péptido 3. Y B) Evaluación del reconocimiento de la proteína recombinante por los Ac anti péptidos 3. ^{a,b}, Letras diferentes indican diferencia estadística mente significativa entre cada inmunización ($P < 0.05$).

Como se muestra en la figura 36 inciso A, para el péptido 3 se observa que no existe una generación de anticuerpos contra este péptido y no existe un reconocimiento

de los anticuerpos contra la proteína quimérica figura 36-B, para esta evaluación se realizó una prueba extra, cuyos resultados se describen en el Apartado 6.5, como nos explica (scheibhofer S, 2017), La estabilidad intrínseca de los antígenos afecta la degradación proteolítica, determinando la disponibilidad de péptidos antigénicos aptos para presentar en el MHC, esto puede afectar el correcto procesamiento/ presentación de estos (Scheibhofer S, 2017).

A) Evaluación de la inmunogenicidad Contra el Péptido 4



B) Evaluación del Reconocimiento de la Proteína Recombinante por los Anticuerpos Anti Péptido 4

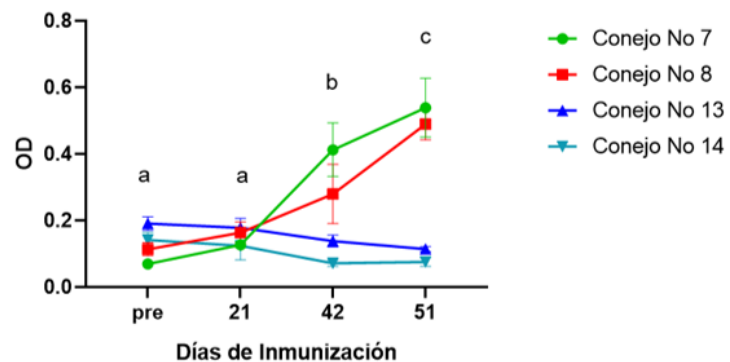


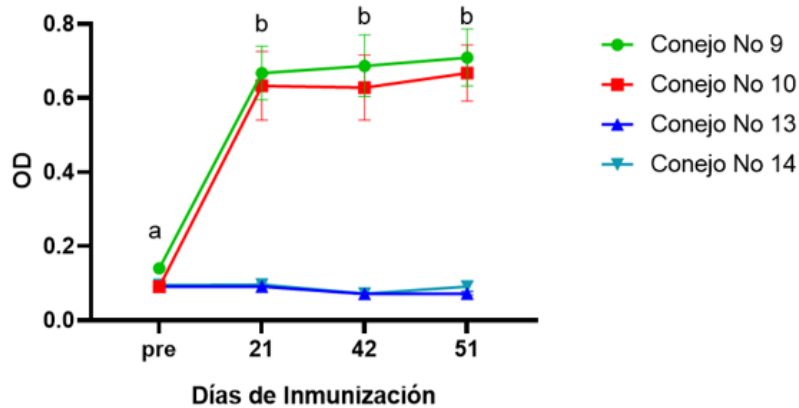
Figura 37 Evaluación de la Inmunogenicidad contra el péptido 4.

A) Evaluación de la inmunogenicidad contra el péptido 4. Y B) Evaluación del reconocimiento de la proteína recombinante por los Ac anti péptidos 4. ^{a,b,c} Letras diferentes indican diferencia estadística mente significativa entre cada inmunización (P<0.05).

Como se observar en la figura 37 inciso A, para el péptido 4 tenemos una generación de anticuerpos contra este péptido desde el día 21 y la mayor generación fue hasta el día 51, también observamos que existe un reconocimiento de los anticuerpos

contra la proteína quimérica y a partir del día 42 tenemos un reconocimiento, que tiene su máximo aumento el día 51 figura 37-B.

A) Evaluación de la inmunogenicidad Contra el Péptido 5



B) Evaluación del Reconocimiento de la Proteína Recombinate por los Anticuerpos Anti Péptido 5

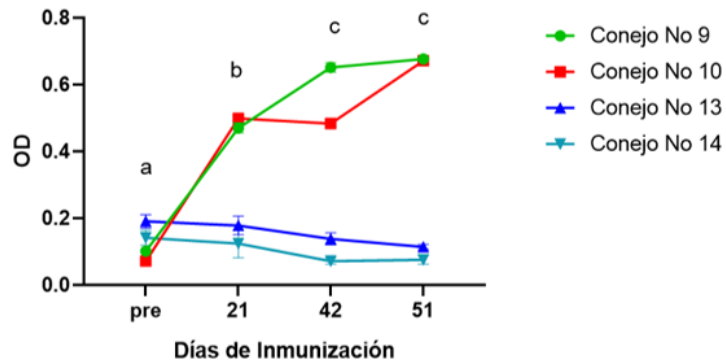
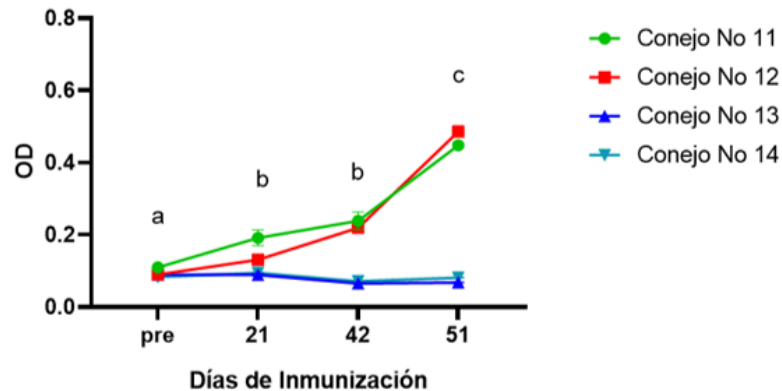


Figura 38 Evaluación de la Inmunogenicidad contra el péptido 5.

A) Evaluación de la inmunogenicidad contra el péptido 5. Y B) Evaluación del reconocimiento de la proteína recombinante por los Ac anti péptidos 5. ^{a,b,c} Letras diferentes indican diferencia estadística mente significativa entre cada inmunización ($P < 0.05$).

Como se muestra en la figura 38 inciso A, para el péptido 5 observamos que tenemos una generación de anticuerpos contra este péptido desde el día 21, esta se mantiene incluso hasta el día 51 y existe un reconocimiento de los anticuerpos contra la proteína quimérica y a partir del día 21 tenemos un reconocimiento que aumenta al día 42 y 51 figura 38-B, este reconocimiento es muy similar al evaluado contra el péptido individual, este fue el único péptido que se comporta de esta forma.

A) Evaluación de la inmunogenicidad Contra el Péptido 6



B) Evaluación del Reconocimiento de la Proteína Recombinante por los Anticuerpos Anti Péptido 6

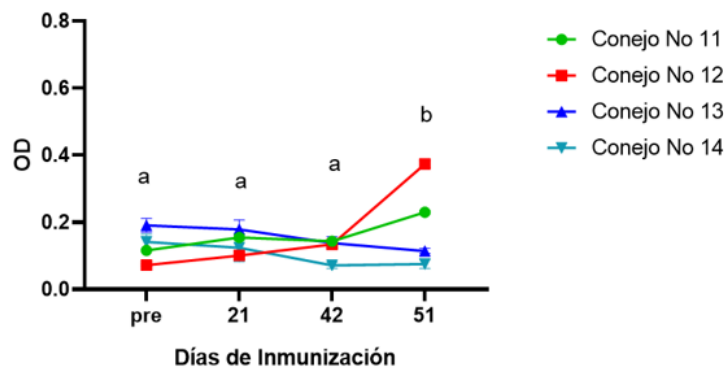


Figura 39 Evaluación de la Inmunogenicidad contra el péptido 6.

A) Evaluación de la inmunogenicidad contra el péptido 6. Y B) Evaluación del reconocimiento de la proteína recombinante por los Ac anti péptidos 6. ^{a,b} Letras diferentes indican diferencia estadística mente significativa entre cada inmunización ($P < 0.05$).

Como se observar en la figura 39 inciso A, para el péptido 6 tenemos una generación de anticuerpos contra este péptido desde el día 21 y la mayor generación fue hasta el día 51, también observamos que existe un reconocimiento de los anticuerpos contra la proteína quimérica y a partir de día 51 tenemos un mayor reconocimiento figura 39-B.

Ensayos de vacunación en conejos realizados en otros estudios han detectado anticuerpos específicos entre la segunda y la tercera semana post inmunización (Bárcena, 2000) En este experimento se demostró que los péptidos sintéticos de forma individual generan anticuerpos específicos lo cual se notó a partir de la segunda inmunización, (Owen J, 2014) describe que mediante la fagocitosis las células presentadoras de antígeno internalizan el antígeno, que es degradado hacia péptido y gracias a diversos procesos interno de la célula este se presenta en la

superficie de las células presentadoras de antígeno, lo que permite el reconocimiento de este por parte de las células B que generaran anticuerpos específicos como se observa en este trabajo

6.5 Resultados de las pruebas extras realizadas al péptido 3

Debido a que no observaron densidades ópticas sugerentes a anticuerpos específicos del péptido 3, se repitió la elaboración de la vacuna nuevamente, repitiendo inmunizaciones a 2 conejos extras y se realizaron pruebas de ELISA extras dando el mismo resultado, por lo que se decidió probar el reconocimiento del péptido 3 por los anticuerpos anti-proteína quimérica obteniendo los siguientes resultados.

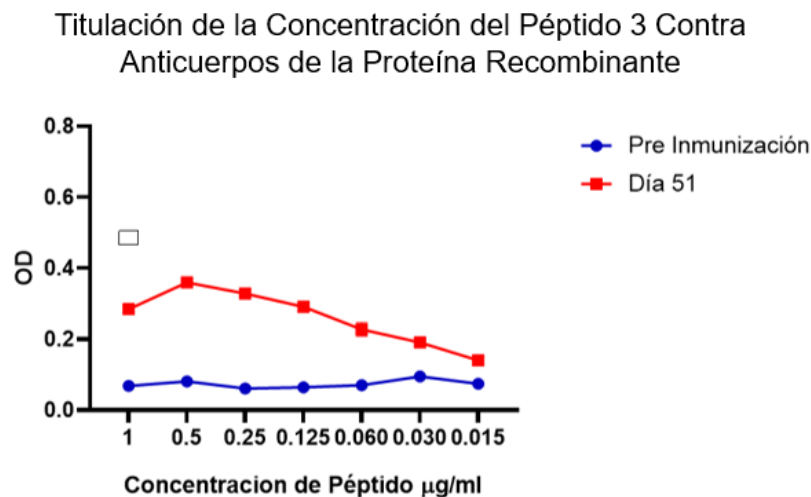


Figura 40 Titulación de la concentración del péptido 3 contra Ac de la proteína quimérica. La concentración de 1 µg/ml fue la seleccionada para utilizarse en los experimentos de evaluación de la inmunogenicidad. □ indican diferencia estadística significativa entre concentración entre concentraciones pre y post ($P < 0.05$).

Como se muestra en la figura 40, de acuerdo a los análisis estadísticos realizados se observa que la concentración con diferencia estadísticamente significativa comparada entre cada dilución evaluada pre y post inmunización fue de 1 µg/ml la cual se usó para los experimentos donde se evaluó la inmunogenicidad contra este péptido, aunque se observa un punto más alto en 0.5, se sospecha de un error de pipeteo y se decidió unificar la mayoría de las concentraciones a 1 µg/ml.

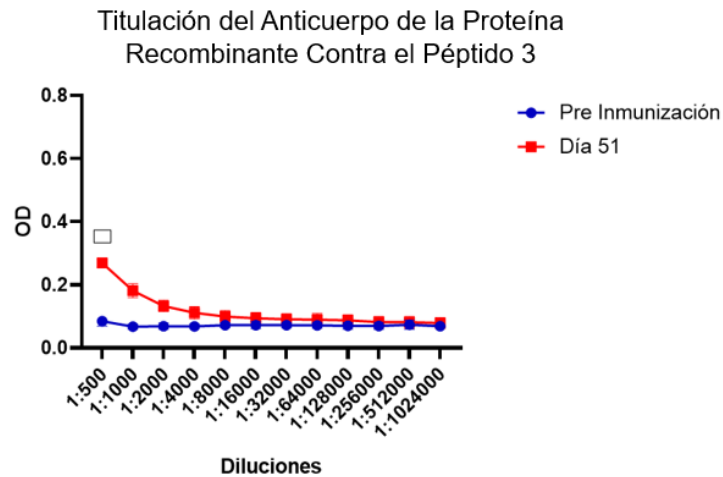


Figura 41 Titulación del Ac de la proteína recombinante contra el péptido 3.

La dilución de 1:500 fue la seleccionada para utilizarse en los experimentos de evaluación de la inmunogenicidad.

□ indican diferencia estadística significativa entre diluciones pre y post ($P < 0.05$).

Como se observa en la figura 41, de acuerdo a los análisis estadísticos realizados se observa que la dilución con diferencia estadísticamente significativa comparada entre cada pre y post inmunización fue la de 1:500, se observan bajas OD debido a que se usa anticuerpo generado a partir de la proteína completa y no son específico del péptido 3, (Salaikumaran, 2022). explica que Cualquier cambio en el orden o composición de los aminoácidos del inmunogeno basado en el péptidos (especialmente secuencias de gran tamaño), pueden sufrir cambios en el plegamiento y la estructura tridimensional. Esto puede cambiar las propiedades biofísicas e inmunogénicas de las proteínas recombinantes limitando la accesibilidad de los epítomos a la superficie, lo cual influye en la inmunogenicidad de las proteínas recombinantes con lo cual observamos que algunas partes de la proteína recombinante que pertenecen al epítomo de este péptido pueden estar internalizado en la estructura tridimensional de esta y por lo tanto no se pueden unir los anticuerpos a estas partes, o bien los anticuerpos no se une con facilidad al péptido porque estos anticuerpos reconocen una parte más limitada del péptido.

VII Conclusiones

Con base en los resultados en el presente trabajo, se concluye lo siguiente:

Los péptidos sintéticos tiene la capacidad de generar anticuerpos específicos, y los anticuerpos de cada péptido usado son capaces de reconocer la proteína quimérica completa.

Los resultados del péptido 3 revelaron que no está teniendo una respuesta inmune debido a que por sí solo no es inmunogénico pero dentro de la proteína quimérica es capaz de generar anticuerpos que son reconocidos por este péptido.

Las titulaciones del péptido 5 mostraron que se generó un buen nivel de anticuerpos a partir del día 21 y la generación se mantuvo prácticamente igual durante todos los muestreos, también se observó que en las titulaciones de anticuerpos al bajar la concentración se lograron mantener.

Los resultados muestran que se podrían hacer más evaluaciones y pruebas a estos péptidos y determinar si pudieran ser utilizados en otras estrategias fuera de la proteína como por ejemplo pruebas diagnósticas para el virus hemorrágico del conejo, el caso más notorio es el péptido 5.

También debemos considerar que aún falta evaluar la vacuna mediante un desafío frente al virus vivo para determinar que estos anticuerpos realmente están dando una protección contra este, un factor importante es que este tipo de pruebas sólo pueden llevarse a cabo en laboratorios de seguridad tipo 3.

VIII Bibliografía

- Abrantes J, v. d. (2012). *Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV)*. Vairao, Portuga: VETERINARY RESEARCH.
- Alvarez, B. M. (2001). *Situación de la cunicultura en México. Lagomorpha (117)*. España.
- Arroyo C., L. J. (2012). *Comité Sistema Producto Cunicola del Distrito Federal, Plan Rectoral*. Distrito .
- Asgari S, H. J. (1998). *Field evidence for mechanical transmission of rabbit haemorrhagic* . Australia: ELSEVIER.
- Bárcena, J. M.-M.-V. (2000). *Journal of virology*. Obtenido de Horizontal transmissible protection against myxomatosis and rabbit hemorrhagic disease by using a recombinant myxoma virus.: <https://doi.org/10.1128/jvi.74.3.1114-1123.2000>
- Cid, R. &. (2023 de febrero de 2021). *MDPI*. Obtenido de Platforms for Production of Protein-Based Vaccines: From Classical to Next-Generation Strategies: <https://doi.org/10.3390/biom11081072>
- Consuelo Lorenzo, A. L.-T.-M. (15 de Agosto de 2020). *La cronica de hoy*. Obtenido de La cronica de Hoy: https://www.cronica.com.mx/notas-la-enfermedad-hemorr_gica_viral_de_los_conejos_llega_a_m_xico-1161343-2020.html
- Cooke, B. (2002). *Rabbit haemorrhagic disease: field epidemiology and the management of wild rabbit populations*. Australia: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation (CSIRO) Sustainable Ecosystems.

- Crowther, J. R. (2009). *The ELISA Guidebook*. Vien, Austria: International Atomic Energy Agency, DGSA. (2020). *Dirección General de Salud Animal*. Mexico.
- DOF, D. O. (1989). *Acuerdo por el que se establece en todo el territorio nacional con carácter obligatorio, general y permanente, la Campaña Nacional Contra la Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos*. Mexico.
- EMA. (2019). *Eravac (vacuna contra la enfermedad hemorrágica del conejo, inactivada)*. Amsterdam: European Medicines Agency/Science Medicines Health.
- Fernández, J. A. (2015). *Conejos y liebres silvestres de México CONABIO. Biodiversitas, 123:7-11*. Mexico.
- Frölich Kai, K. F. (1998). *Antibodies against rabbit hemorrhagic disease virus in free- ranging red*. Berlin, Germany: Journal of Wildlife Diseases.
- Gleeson M., P. O. (2020). *Emerging infectious diseases of rabbits*. EU: vetexotic theclinics.
- Herbosa, R. (2011). *PARASITOSIS COMUNES INTERNAS Y EXTERNAS CONSEJOS DESDE LA OFICINA DE FARMACIA. ÁMBITO FARMACÉUTICO EDUCACIÓN SANITARIA*.
- INEGI. (2007). *Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Censo*. Mexico.
- Irene Ramirez, J. C. (2021). *ENFERMEDAD HEMORRÁGICA DEL CONEJO*. Valencia, España: CEU Cardenal Herrera.
- Judith Owen, J. P. (2014). *KUBY INMUNOLOGÍA*. Mexico, DF: Mc Graw Hill, Séptima edición pg. 574.
- Kimura, T. I. (2001). *Distribution of rabbit haemorrhagic disease virus RNA in experimentally infected rabbits*. Hokkaido, Japón: ELSEVIER.
- Leighton, F. (1995). *Antibody Response to Rabbit Viral Hemorrhagic Disease Virus in Red Foxes (Vulpes vulpes)*. Berlin, Germany: Journal of Wildlife Diseases.
- Lin, A. V. (15 de octubre de 2016). *Springer Science*. Obtenido de Indirect ELISA. In ELISA: Methods and protocols : <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2742-5>
- Mariola Penadés, I. G. (2011). *Toma de muestras en explotaciones cunícolas para enviar al laboratorio*. Valencia, España.
- Marques RM, C. E. (2010). *Early acute depletion of lymphocytes in calicivirus-infected adult rabbits*. Vet Res Commun.
- Mendoza, B. (2001). *Situación de la cunicultura en México*. Barcelona: Lagomorpha. No. 117. Pp 60-68.
- Mount A, K. S. (09 de junio de 2014). *Combination of adjuvants: The future of vaccine design*. Obtenido de <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/14760584.2013.811185>

- Muthu Raj Salaikumar, P. S. (s.f.).
- Nyström, K. G.-R.-C.-V. (2011). *Histo-blood group antigens act as attachment factors of rabbit hemorrhagic disease virus infection in a virus strain-dependent manner*. EU: PLoS Pathog.
- Ohlinger, B. H. (1993). *Rabbit hemorrhagic disease (RHD): characterization of the causative calicivirus*. Tubingen, Germany: ELSEVIER.
- OIE, O. M. (2019). *Código Sanitario para los Animales Terrestres*. París, Francia.
- Olafsdottir T, L. M. (29 de septiembre de 2015). *Molecular signatures of vaccine adjuvants*. Obtenido de <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.04.099>.
- OMS. (30 de Agosto de 2021). *ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD*. Obtenido de ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD: <https://www.who.int/es/news-room/questions-and-answers/item/vaccines-and-immunization-what-is-vaccination>
- Picazo JJ, G.-R. F. (2007). *Futuro en el desarrollo de vacunas*. España: ELSEVIER.
- Roca, T. (1996). *Aspectos del desarrollo cunícola en México*. Boletín de cunicultura #85.
- Rosell, J. L. (2019). *Myxomatosis and Rabbit Haemorrhagic Disease: A 30-Year Study of the Occurrence on Commercial Farms in Spain*. española: Animals.
- Ruiz Lang, G. (1993). *Aparición de la enfermedad vírica hemorrágica en México y su erradicación (EHVC)*. mexico: Revista .
- Salaikumar, P. S. (2022). *An in silico approach to study the role of epitope order in the multi-epitope-based peptide (MEBP) vaccine design*. scientific reports, www.nature.com/scientificreports.
- Sánchez, C. C. (2020). *Enfermedad vírica hemorrágica del conejo: revisión*. Barcelona, España: Ceva Salud Animal, S.A.
- Sandra Scheiblhofer, J. L. (2017). *Influence of protein fold stability on immunogenicity and its implications for vaccine design*. Taylor & Francias, <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14760584.2017.1306441>.
- SENASICA. (2020). *Sistema de Información Nacional de Enfermedades Exóticas y Emergentes*. Mexico.
- SINIIGA. (2020). *Sistema Nacional de Identificación Individual del Ganado (SINIIGA)*. Mexico.
- Spickler, A. R. (2020). *Rabbit Hemorrhagic Disease and OtherLagoviruses*. Ames, Iowa, Estados Unidos: The Centre for food security & public health.
- Trzeciak-Ryczek, A. B.-D. (2015). *The importance of liver lesions and changes to biochemical and coagulation factors in the pathogenesis of RHD*. Acta Biochim Polemia.

USDA, U. S. (2020). *General Guidance for Cleaning and Disinfection of Rabbit*. Animal and Plant Health Inspection Service.

Vallejo, D. I.-M.-G. (2014). *Autophagic response in the Rabbit Hemorrhagic Disease, an animal model of virally-induced fulminant hepatic failure*. Londres, Reino unido: VETERINARY RESEARCH.

IX Anexos

- PBS estéril (phosphate buffered saline)
Para prepara un litro de solución se peso NaCl 8.9g, KCl 0.2g, Na₂HPO₄ 1.4g, KH₂PO₄ 0.2g en la báscula y se diluyen en un recipiente de cristal con 900 ml de agua destilada, después de homogenizar bien se ajustó el pH a 7.4 con ácido clorhídrico y se colocó el agua destilada faltante para llegar al volumen de 1 litro, para PBS estéril se metió la solución a la autoclave a 120°C POR 15 minutos, y se deja enfría para poder utilizarse, para las pruebas de ELISA no es necesario que este estéril pero sí que sea PBS-T para esto se colocan 500 µl de tween.
- Solución de bloqueo (leche al 5%)
Para prepara la solución de bloqueo con leche al 5 % realiza mediante una regla de 3 dependiendo que la cantidad a utilizar por ejemplo para preparar 80 ml se requieren 5g de leche descremada esto se calculó multiplicando los 80 ml requeridos por 5 y dividiéndolo entre 100 para sacar el 5 %, y se pesan los 5g en la báscula, se colocan en un recipiente del volumen requerido y se mide y agrega PBS-T necesario en este ejemplo 80 ml y se agita para homogenizar.
- Solución de revelado
Para prepara la solución de revelado que se requiere para una placa de ELISA se pesa OPD (diclorhidrato de o-fenilendiamina) 4 µg o 0.004 g en la báscula, este debe mantenerse frío y protegido de la luz, también se requiere (citrato de sodio 0.1 M) 5 ml, (ácido cítrico 0.1 M) 5ml y 4 µg de H₂O₂, la solución de revelado se prepara en el momento en que se terminan de realizar los últimos 3 lavados que corresponden a la incubación de anticuerpo secundario.