



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales  
Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia



## EVALUACIÓN PRECLÍNICA DE UNA VACUNA CONTRA COVID-19 EN OVINOS Y CAPRINOS

### TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el título de  
Licenciado en Medicina Veterinaria y Zootecnia

#### Presenta:

Mauricio Medina Hernández

#### Dirigido por:

Juan Joel Mosqueda Gualito

#### SINODALES

Juan Joel Mosqueda Gualito  
Presidente

---

Diego Josimar Hernández Silva  
Secretario

---

Bertha Isabel Carvajal Gámez  
Vocal

---

Carlos Agustín Vega y Murguía  
Vocal

---

Juan Carlos Silva Jarquin  
Vocal

---

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Febrero, 2021

## 1. Resumen

Este trabajo evaluó la fase preclínica de una vacuna contra COVID-19 en ovinos y caprinos para determinar la seguridad, inmunogenicidad y dosis vacunal. La proteína recombinante en la que se basa la vacuna se extrajo y purificó mediante cromatografía por afinidad a níquel, de la biomasa de un cultivo inducido de una clona de *E. coli* BL21. Las dosis se prepararon emulsionando adyuvante comercial con la proteína purificada en solución salina amortiguadora de fosfatos (pH 7.40). Veinte caprinos se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos recibiendo dosis de 100, 60, 30 y 0 µg de proteína; ocho ovinos se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos recibiendo dosis de 100 y 0 µg de proteína. Se administraron dosis subcutáneas de 1 ml los días 0 y 21. Se recolectó sangre los días 0, 10, 21, 31 y 50 para obtención de suero. La inmunogenicidad se evaluó mediante la determinación de anticuerpos por *ELISA* indirecta. La seguridad se evaluó monitoreando el estado general, temperatura rectal, reactividad de linfonodos regionales, reacción en el sitio de aplicación, ganancia diaria de peso (GDP), hemograma y medición de actividad sérica de alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST). La proteína vacunal fue inmunogénica en caprinos, apreciándose diferencia estadística ( $P < 0.05$ ) desde el décimo día, no hubo diferencia estadística ( $P > 0.05$ ) entre los grupos de 100 y 60 µg. No se encontró diferencia estadística en la GDP ( $P > 0.05$ ), no se encontraron alteraciones en el estado general, hemograma general, ni actividad sérica de ALT y AST; se encontró fiebre leve transitoria, reactividad de linfonodos regionales, inflamación y edema leves en el sitio de aplicación que desaparecieron a las 72 horas. Se concluye que la vacuna contra COVID-19 evaluada en ovinos y caprinos fue inmunogénica y segura. La dosis evaluada en caprinos con mejor resultados es la de 60 microgramos.

**Palabras clave:** COVID-19, fase preclínica, ovinos, caprinos.

## 2. Summary

The present work evaluated a COVID-19 vaccine in a preclinical trial with sheep and goats in order to determine safety, immunogenicity and optimal dose. The recombinant protein was produced in a transformed BL21 *E. coli* clone culture, extracted and purified by immobilized nickel-affinity chromatography. Vaccine doses were prepared emulsifying commercial adjuvant with the purified protein diluted in phosphate buffered saline (pH 7.40). Twenty goats were randomly distributed into four groups, receiving 100, 60, 30 and 0 protein  $\mu\text{g}$  doses; eight sheep were randomly distributed into two groups receiving 100 and 0 protein  $\mu\text{g}$  doses. Vaccines were administrated subcutaneously in 1 ml doses at 0 and 21 days. Serum samples were collected at 0, 10, 21, 31 days. Immunogenicity was obtained by antibody determination by indirect ELISA. Safety was determined by monitoring animals' overall status, body temperature, regional lymph node reactivity, application site reaction, daily weight gain (DWG), complete hemogram, and AST and ALT seric activity. The vaccine was immunogenic in goats, finding statistical difference ( $P < 0.05$ ) since 10th PID, there was no statistical difference ( $P > 0.05$ ) between 100 and 60  $\mu\text{g}$  dose groups. It was not found statistical difference ( $P > 0.05$ ) in DWG, neither alterations in animal's overall status, complete hemogram, and seric ALT and AST activity; it was found mild transitory fever, regional lymphnode reactivity, mild inflammation and edema at the application site that disappeared after 72 hours. It is concluded that the vaccine evaluated in sheep and goats was immunogenic and safe. The best dose evaluated was 60 micrograms.

**Key words:** COVID-19, preclinical trial, sheep, goats.

### **3. Dedicatoria**

A mis profesores, amigos y familia, quienes, sin su guía, consejo, apoyo, y entendimiento, no me encontraría en este lugar.

A Juan Mosqueda, por su entendimiento y paciencia inacabables.

A Nuria, Laura, la cabra Carol 075 y sus compañeras, por brindarme ánimos de seguir viviendo.

«No me digan ustedes en donde están mis ojos,  
pregunten hacia dónde va mi corazón».

*(El llanto fracasado. Sabines, J.)*

#### **4. Agradecimientos**

Se agradece al proyecto de la Secretaría de Relaciones Exteriores – AMEXCID y a la beca recibida de la Universidad Autónoma de Querétaro.

A mi director Juan Joel y asesores Diego, Bertha, Carlos y Juan Carlos por su invaluable tiempo, dirección y apoyo otorgados.

A mis compañeros del laboratorio Miguel, Susana, Alma, Aldo, Chyntia, Andrés, Carlos, Abigail, Jacobo, Luis y Daniel por su valioso apoyo, consejo, acompañamiento y asistencia.

A los médicos Andrea y Omar, a Alejandro, Carina y Carapia por su inestimable ayuda.

A mi familia por su apoyo incondicional.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

## 5. Índice de contenido

1. Resumen .....	i
2. Summary .....	ii
3. Dedicatoria.....	iii
4. Agradecimientos .....	iv
5. Índice de contenido.....	v
6. Índice de cuadros .....	viii
7. Índice de figuras .....	ix
8. Introducción .....	10
8.1. Justificación.....	10
8.2. Hipótesis .....	12
8.3. Objetivo general .....	12
8.4. Objetivos específicos .....	12
9. Revisión de literatura .....	13
9.1. COVID-19.....	13
9.1.1. Definición.....	13
9.1.2. Historia .....	13
9.1.3. Etiología y taxonomía .....	13
9.1.4. Replicación .....	14
9.1.5. Especies afectadas.....	15
9.1.6. Factores predisponentes .....	15
9.1.7. Transmisión .....	16
9.1.8. Patogénesis.....	16
9.1.9. Cuadro clínico.....	16
9.1.10. Lesiones macroscópicas .....	17

9.1.11.	Lesiones microscópicas .....	17
9.1.12.	Hallazgos de laboratorio clínico.....	17
9.1.13.	Diagnóstico.....	17
9.1.14.	Diagnósticos diferenciales.....	18
9.1.15.	Tratamiento .....	18
9.1.16.	Control y prevención.....	18
9.2.	Evaluación de vacunas .....	19
9.2.1.	Proceso de desarrollo.....	19
9.2.2.	Pruebas preclínicas de seguridad y toxicidad.....	20
9.2.3.	Consideraciones específicas para una vacuna contra COVID-19 .....	20
10.	Material y métodos .....	22
10.1.	Antígeno vacunal .....	22
10.1.1.	Expresión del antígeno vacunal .....	22
10.1.2.	Extracción.....	22
10.1.3.	Purificación.....	23
10.1.4.	Cuantificación.....	24
10.1.5.	Elaboración de dosis vacunal.....	24
10.2.	Evaluación de seguridad e inmunogenicidad de la vacuna en ovinos ..	25
10.2.1.	Selección de individuos.....	25
10.2.2.	Conformación de grupos .....	26
10.2.3.	Inmunización .....	27
10.2.4.	Seguridad .....	27
10.2.5.	Inmunogenicidad .....	28
10.3.	Evaluación de seguridad e inmunogenicidad de la vacuna en caprinos	29
10.3.1.	Selección de individuos.....	29

10.3.2.	Conformación de grupos .....	30
10.3.3.	Inmunización .....	31
10.3.4.	Seguridad .....	31
10.3.5.	Inmunogenicidad .....	32
10.4.	Determinación de dosis vacunal .....	33
11.	Resultados y discusión .....	34
11.1.	Obtención del antígeno vacunal.....	34
11.2.	Evaluación de seguridad e inmunogenicidad en ovinos .....	36
11.2.1.	Seguridad .....	36
11.2.2.	Inmunogenicidad .....	42
11.3.	Evaluación de seguridad e inmunogenicidad en caprinos .....	44
11.3.1.	Seguridad .....	44
11.3.2.	Inmunogenicidad .....	53
11.4.	Determinación de dosis vacunal .....	55
12.	Conclusión.....	59
13.	Consideraciones.....	60
14.	Referencias .....	61
15.	Apéndice 1 – Equipo, materiales y soluciones .....	70
15.1.	Equipos .....	70
15.2.	Reactivos .....	70
15.3.	Consumibles .....	71
15.4.	Soluciones .....	71
16.	Apéndice 2 – Valores clínicos de referencia para ovinos y caprinos .....	73

## 6. Índice de cuadros

<b>Cuadro 1:</b> Vacunas más avanzadas contra COVID-19.....	11
<b>Cuadro 2:</b> Protocolo de diálisis.....	24
<b>Cuadro 3:</b> Formulación de dosis vacunales.....	25
<b>Cuadro 4:</b> Temperatura rectal postvacunación en ovinos.....	37
<b>Cuadro 5:</b> Reactividad de linfonodos regionales en ovinos.....	38
<b>Cuadro 6:</b> Reacciones locales postvacunación en ovinos.....	39
<b>Cuadro 7:</b> Hemograma completo de ovinos.....	40
<b>Cuadro 8:</b> Ganancia diaria de peso en ovinos.....	41
<b>Cuadro 9:</b> Temperatura rectal postvacunación en caprinos.....	45
<b>Cuadro 10:</b> Reactividad de linfonodos regionales en caprinos.....	47
<b>Cuadro 11:</b> reacciones locales postvacunación en caprinos.....	49
<b>Cuadro 12:</b> Hemograma completo de caprinos.....	51
<b>Cuadro 13:</b> Interpretación de hemogramas caprinos.....	52
<b>Cuadro 14:</b> Ganancia diaria de peso en caprinos.....	53
<b>Cuadro 15:</b> Rangos hematológicos de referencia para ovinos y caprinos.....	73
<b>Cuadro 16:</b> Perfil hepático de referencia para ovinos y caprinos.....	73

## 7. Índice de figuras

<b>Figura 1:</b> Microfotografía de vacuna emulsionada.....	34
<b>Figura 2:</b> Pureza e integridad de la proteína recombinante empleada como antígeno vacunal.....	35
<b>Figura 3:</b> Determinación de anticuerpos promedio por grupo ovino. ....	42
<b>Figura 4:</b> Determinación de anticuerpos por individuo, por grupo ovino.....	43
<b>Figura 5:</b> Determinación de anticuerpos por individuo, por grupo caprino. ....	55
<b>Figura 7:</b> Determinación de anticuerpos promedio por grupo caprino.....	¡Error!
<b>Marcador no definido.</b>	
<b>Figura 8:</b> Comparación estadística de los grupos caprinos.....	57

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

## 8. Introducción

La enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) es una enfermedad infecciosa producida por un nuevo coronavirus (SARS-CoV-2) que surgió en China a finales del 2019 y se convirtió en pandemia mundial a principios de marzo del 2020 (Jahangir *et al.*, 2020). A casi un año de su aparición, la enfermedad ha cobrado alrededor de 1.39 millones de vidas en todo el mundo y ha provocado pérdidas económicas incalculables (OMS, 2020<sup>a</sup>). Por esta razón, los científicos de todo el mundo se han enfrascado en una carrera sin precedentes para producir alguna vacuna eficaz, trabajando a marchas forzadas para comprimir en unos pocos meses un proceso que tradicionalmente demora más de una década.

Una vacuna es un compuesto biológico que estimula en el cuerpo una respuesta inmune capaz de brindar protección contra la infección natural por un patógeno (ATAGI, 2018). La importancia de la vacunación radica en que brinda al cuerpo la oportunidad de desarrollar protección contra enfermedades antes de entrar realmente en contacto con los agentes patógenos de campo. Calificadas por la Organización Mundial de la Salud como «una de las mejores inversiones en salud que el dinero puede comprar», las vacunas previenen más de 20 enfermedades mortales, previenen 2-3 millones de muertes cada año por enfermedades como difteria, tétanos, influenza, sarampión y tos ferina, además de que la vacunación es parte crítica en la prevención y control de brotes de enfermedades infecciosas (OMS, 2021<sup>b</sup>).

La regulación de las vacunas se divide en tres etapas: desarrollo, licenciatura y postlicenciatura; el desarrollo consiste de dos partes: estudios preclínicos y estudios clínicos en tres fases. Los estudios preclínicos se llevan a cabo *in vitro* e *in vivo* en modelos animales. El objetivo principal de los estudios preclínicos es demostrar que la nueva vacuna es adecuada para pruebas en humanos, además de establecer la seguridad e inmunogenicidad (OMS, 2016).

### 8.1. Justificación

A finales del 2019 apareció en el mundo un nuevo virus, el cual en pocos meses pasaría a la historia como el primer coronavirus conocido en causar una pandemia

mundial. A un año, se registraron en el mundo 58.9 millones de casos confirmados y 1.39 millones de muertes, (OMS, 2020<sup>a</sup>).

Para la primera semana del 2021, el mundo contaba con diez vacunas contra COVID-19 en uso, pero ninguna de aprobación universal (OMS, 2021<sup>a</sup>):

**Cuadro 1:** Vacunas más avanzadas contra COVID-19.

Desarrollador	Nombre	Eficacia reportada (%)	Estatus
Pfizer-BioNTech	Comirnaty	95	Aprobada en Canadá y otros países, aprobado uso de emergencia en EE.UU. y otros países
Moderna	mRNA-1273	94.5	Aprobada en Canadá, aprobado uso de emergencia en EE.UU. la UE e Israel
Gamaleya	Sputnik V	91.4	Uso temprano en Rusia, aprobado uso de emergencia en Bielorrusia y otros países
Oxford-AstraZeneca	AZD1222	90	Aprobado uso de emergencia en Reino Unido, India y otros países
CanSinoBIO	Convidecia	—	Uso limitado en China
Vector Institute	EpiVacCorona	—	Uso temprano en Rusia
Sinopharm	BBIBP-CorV	79.34	Aprobada en China, Emiratos Árabes Unidos y Bahréin, aprobado uso de emergencia en Egipto
Sinovac	PiCoVacc	78	Uso limitado en China
Sinopharm-Wuhan	—	—	Uso limitado en China y Emiratos Árabes Unidos
Bharat Biotech	Covaxin	—	Aprobado uso de emergencia en la India

Organización Mundial de la Salud (2021<sup>a</sup>).

Las primeras pruebas que se llevan a cabo en el desarrollo de vacunas son los ensayos preclínicos, los cuales se realizan tradicionalmente en modelos animales, siendo los primates no humanos, roedores, conejos y animales de granja los más comunes (OMS, 2016). Gracias a la bioinformática y a los ensayos *in vitro*, el número de animales requeridos para los estudios preclínicos se ha reducido, no obstante, el desarrollo de vacunas humanas sigue dependiendo del uso de animales de investigación, pues el fin último de toda vacuna es generar una respuesta inmune protectora y memoria del patógeno de interés, algo que solo se puede apreciar en

un animal vivo. Elegir el modelo animal adecuado es crucial para el éxito de una vacuna, pues los estudios traslacionales dependen de la similitud de la respuesta inmune del huésped y patogenia de la enfermedad, comparada con el humano (Gerdtts *et al.*, 2015).

Los ovinos y caprinos han sido utilizados como modelos animales para estudios en diversas áreas de la salud, entre las que destacan cirugía, farmacología, oftalmología, cardiología, neurología e inmunología (Bezós *et al.*, 2009; Hein & Gribel, 2003; Zhang, Drapeau, *et al.*, 2012). Los ovinos son particularmente útiles en la investigación de vacunas, ya que, aunque los marcadores concernientes al estudio de la inmunidad no están tan desarrollados como en roedores, es posible evaluar los parámetros clave como marcadores principales de superficie y citocinas, aunado a la variedad de anticuerpos monoclonales ovino-específicos, y la gran cantidad de reactividad cruzada de moléculas ovinas con anticuerpos humano-específicos. El tamaño de las ovejas y las cabras permite evaluar vías de administración representativas de humanos y dar seguimiento de la respuesta inmune en tiempo real en un solo individuo, evitando los problemas asociados a las diferencias de respuesta inmune entre humanos y roedores (Scheerlinck *et al.*, 2008).

## **8.2. Hipótesis**

La vacuna contra COVID-19 desarrollada por la UAQ es segura e inmunogénica en ovinos y caprinos.

## **8.3. Objetivo general**

Evaluar la inmunogenicidad y seguridad de la vacuna desarrollada por la UAQ contra COVID-19 en ovinos y caprinos.

## **8.4. Objetivos específicos**

1. Obtener la proteína vacunal
2. Evaluar la seguridad e inmunogenicidad de la vacuna en ovinos
3. Evaluar la seguridad e inmunogenicidad de la vacuna en caprinos
4. Determinar la dosis vacunal

## 9. Revisión de literatura

### 9.1. COVID-19

#### 9.1.1. Definición

Se trata de una enfermedad infecciosa producida por un coronavirus recientemente descubierto, caracterizada por enfermedad respiratoria de leve a moderada, aunque algunas personas pueden desarrollar cuadro grave, o cursar como asintomáticas (CDC, 2020); en febrero del 2020, la Organización Mundial de la Salud, en colaboración con la Organización Mundial para la Sanidad Animal (OIE) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), acuñó el nombre «COVID-19» para referirse a la «enfermedad por coronavirus 2019» (OMS, 2021<sup>a</sup>).

#### 9.1.2. Historia

El primer caso de COVID-19 apareció por primera vez en la ciudad de Wuhan, provincia Hubei, China, en noviembre de 2019. El primer caso fuera de China fue reportado el 13 de enero de 2020 en Tailandia, el 30 de enero, con 7,736 casos confirmados en China y 82 casos confirmados en 18 países, la OMS declaró emergencia sanitaria mundial (Jahangir *et al.*, 2020). El 28 de febrero de 2020, se confirmaron los primeros dos casos en México, ambos importados de Italia (Secretaría de Salud, 2020). Su rápida propagación por el mundo llevó a OMS a declarar «pandemia» el 11 de marzo del 2020 (Liu *et al.*, 2020). México cerró el 2020 con 1,448,755 casos confirmados, y 127,123 defunciones (DGE, 2021).

#### 9.1.3. Etiología y taxonomía

El COVID-19 es causado por el coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo 2 (SARS-CoV-2), un virus envuelto, esférico, de aproximadamente 120 nm de diámetro, para el cual, el Comité Internacional sobre Taxonomía Viral (ICTV) y su Grupo de Estudio *Coronavirinae* (CSG) asignaron la siguiente clasificación taxonómica (Gorbalenya *et al.*, 2020):

- **Categoría:** Coronavirus
- **Reino:** *Ribovira*

- **Orden:** *Nidovirales*
- **Suborden:** *Cornidovirineae*
- **Familia:** *Coronaviridae*
- **Subfamilia:** *Orthocoronavirinae*
- **Género:** *Betacoronavirus*
- **Subgénero:** *Sarbecovirus*
- **Especie:** *Coronavirus relacionados con el síndrome respiratorio agudo severo.*
- **Individuo:** SARS-CoV-2

Su material genético consta de ARN monocatenario de polaridad positiva, con 29,903 nucleótidos, una capucha 5' de metil-guanosina, y una cola de poli-A que lo asemejan al ARNm de las células. El genoma transcribe nueve ARN subgenómicos, tiene una región 5' no traducida, un marco de lectura abierto (ORF 1a/ab) que codifica proteínas no estructurales para su replicación (NSP), cuatro proteínas estructurales, espícula (S), envoltura (E), membrana (M), y nucleocápside (N); varias proteínas accesorias (ORF 3a, 6, 7a/b y 8), y una región 3' no traducida (Liu *et al.*, 2020).

#### 9.1.4. Replicación

La proteína S es escindida en las subunidades S1 y S2 por la proteasa celular TMPRSS2, la región C-terminal de S1 utiliza la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) como receptor, y la fusión de membranas ocurre por vía endosomal. El material genético liberado en el citoplasma transcribe la replicasa poliprotéica viral, la cual transcribe varias copias de ARNm subgenómico que codifican las proteínas estructurales. Las proteínas S, E y M entran al retículo endoplásmico (RE) y el aparato de Golgi, mientras que la proteína N se une a copias genómicas para formar complejos nucleoprotéicos. Los viriones son ensamblados en el compartimiento intermedio RE-Golgi y posteriormente son liberados de la célula infectada (Hoffmann *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2020).

### 9.1.5. Especies afectadas

Aunque quizá nunca se esclarezca de donde proviene del SARS-CoV-2, se acepta que es de origen zoonótico. Se cree que los murciélagos forman un reservorio natural, debido a que son afectados por otros coronavirus estrechamente relacionados, por la misma razón, se cree que el pangolín malayo (*Manis javanica*) puede fungir como huésped intermediario (Abdel-Moniem & Abdelwhab, 2020).

Se han reportado en varias partes del mundo la infección natural de humano a gato, de humano a tigres malayos y leones africanos en un zoológico de Nueva York, y de humano a visón en Países Bajos (Abdel-Moniem & Abdelwhab, 2020).

Existen dos reportes de perros infectados naturalmente con SARS-Cov-2, los cuales no presentaron signos clínicos, sin embargo, estudios en varias partes del mundo no han encontrado pruebas de infección en condiciones similares de cohabitación humano-perro. Las infecciones experimentales han demostrado la seroconversión y excreción baja de virus en algunos individuos, así como la ausencia de material viral y seroconversión en cohabitación perro-perro (Abdel-Moniem & Abdelwhab, 2020).

Experimentalmente, se han infectado el mono Rhesus (*Macaca mulatta*), hurón (*Mustela putorius*), ratón transgénico que expresa el receptor humano a ACE2, ratón BALB/C sin células T y B funcionales, hámster sirio dorado (*Mesocricetus auratus*), gato (*Felis silvestris catus*), musaraña, murciélago egipcio de la fruta (*Rousettus aegyptiacus*); no se ha podido demostrar la susceptibilidad del cerdo (*Sus scrofa domestica*), pollo doméstico (*Gallus gallus domesticus*), pato (*Anas platyrhynchos domesticus*), pavo (*Meleagris gallopavo domesticus*), codorniz (*Coturnix coturnix*) y ganso (*Anser anser domesticus*; Abdel-Moniem & Abdelwhab, 2020).

### 9.1.6. Factores predisponentes

Se ha estudiado la asociación existente entre varios factores y la severidad del cuadro clínico, entre los cuales destacan: sexo masculino, edad avanzada, obesidad, diabetes, hipertensión enfermedades bacterianas concurrentes, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad cardíaca coronaria, enfermedad cardiovascular, malfuncionamiento hepático o renal, linfocitopenia,

niveles elevados de alanina aminotransferasa y creatinina cinasa, sensibilidad a la troponina cardiaca I, y condición inmunocomprometida (Chen *et al.*, 2020; Miller & Englund, 2020; Noor 2020).

#### **9.1.7. Transmisión**

Se cree que la principal ruta de trasmisión es por exposición a los aerosoles y gotas expulsados por una persona enferma o asintomática al hablar, toser o estornudar; el contacto con superficies contaminadas representa un mecanismo de trasmisión viable, pero de menor importancia (Wiersinga *et al.*, 2020) En la transmisión del SARS-CoV-2, los individuos asintomáticos y presintomáticos juegan un papel importante, pues albergan suficiente carga viral en el tracto respiratorio superior para ser contagiosos, mientras pasan desapercibidos (Gandhi *et al.*, 2020).

#### **9.1.8. Patogénesis**

Se presenta un periodo de incubación de entre 4 y 7 días, con promedio de 5.2 días (Carter-Timofte *et al.*, 2020), las células blanco son el epitelio nasal y bronquial, neumocitos y endotelio alveolar. El daño alveolar puede desencadenar la formación de microtrombos y evolucionar en problemas trombo-embólicos, el estado terminal, se desarrolla disfunción multiorgánica a consecuencia de la respuesta del cuerpo a la infección; en los casos fulminantes ocurre activación de la coagulación y consumo de factores por coagulación intravascular diseminada. Se ha visto que aproximadamente el 8% de los pacientes intubados desarrollan infecciones bacterianas o fúngicas secundarias (Wiersinga *et al.*, 2020).

#### **9.1.9. Cuadro clínico**

La enfermedad puede ser asintomática, o presentarse de diferentes formas, siendo la más común el cuadro leve (81% de los casos), seguido del cuadro severo (14%) y el crítico (5%). Los signos y síntomas más comunes son fiebre, tos seca, vómito, diarrea, falta de aliento, náusea dolor de cabeza, mialgia, y disfunción del olfato y gusto; las complicaciones incluyen dificultad de la función cardiaca, cerebral, pulmonar, hepática, renal y de la coagulación. Los cuadros más graves se deben a falla respiratoria hipóxica e infecciones bacterianas concurrentes (Miller & Englund, 2020; Wiersinga *et al.*, 2020).

### **9.1.10. Lesiones macroscópicas**

A la necropsia, los pulmones se presentan pesados, de consistencia firme y color azulado-rojizo; son apreciables áreas difusas de consolidación, bronconeumonía supurativa (Menter *et al.*, 2020). En la tomografía computarizada de tórax se aprecian habitualmente opacidades difusas periféricas como vidrio molido, con bordes pobremente definidos, broncograma aéreo, engrosamiento ligero o irregular de los septos interlobulares, engrosamiento pleural y consolidación (Dai *et al.*, 2020; Hani *et al.*, 2020; Wiersinga *et al.*, 2020).

### **9.1.11. Lesiones microscópicas**

Los pulmones muestran daño alveolar difuso, congestión capilar severa, engrosamiento de la pared alveolar, hiperplasia de neumocitos II reactivos, con infiltrado mononuclear a la luz, microtrombos, edema y deposición de fibrina en la luz alveolar, fibrosis intersticial difusa con infiltrado mononuclear (Menter *et al.*, 2020; Wiersinga *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020). En los riñones pueden encontrarse signos de choque como daño tubular difuso, luz tubular ensanchada, aplanamiento del epitelio tubular, y edema intersticial (Menter *et al.*, 2020).

### **9.1.12. Hallazgos de laboratorio clínico**

Los hallazgos típicos de un cuadro de COVID-19 incluyen incremento de la proteína C reactiva, de la lactato deshidrogenasa, de la alanina aminotransferasa y de la aspartato aminotransferasa; hay reducción de la albúmina, linfopenia, coagulopatías, tiempo de protrombina elevado, trombocitopenia moderada, y elevación en el valor de dímeros D (Miller & Englund, 2020; Wiersinga *et al.*, 2020).

### **9.1.13. Diagnóstico**

El diagnóstico definitivo se basa en la detección del material genético del virus. La reacción en cadena de la polimerasa acoplada a retrotranscriptasa (RT-PCR) es la prueba diagnóstica estándar, sin embargo, su sensibilidad y porcentaje de falsos negativos varía según el tiempo en que se toma la muestra, con respecto del momento de la infección y presentación de signos, la forma de toma de muestra y tipo de muestra. Se han desarrollado también pruebas de amplificación isotérmica mediada por horquillas acoplada a retrotranscriptasa (RT-LAMP; Kashir &

Yaqinuddin, 2020; Yu *et al.*, 2020). Las pruebas serológicas pueden indicar si el individuo estuvo expuesto al virus, siendo la IgM detectable desde el quinto día postinfección (Wiersinga *et al.*, 2020). La tomografía computarizada es una gran herramienta para el diagnóstico presuntivo, pues las lesiones pulmonares pueden apreciarse desde los primeros tres días luego de iniciado el cuadro clínico (Dai *et al.*, 2020; Hani *et al.*, 2020).

#### **9.1.14. Diagnósticos diferenciales**

Las lesiones vistas por tomografía computarizada provocadas por el virus son difíciles de distinguir de las ocasionadas por la influenza A, B, citomegalovirus, adenovirus, virus sincitial respiratorio, SARS-CoV, y algunas neumonías bacterianas. Otras condiciones no infecciosas que ocasionan las mismas lesiones incluyen edema pulmonar, efusión pleural y linfadenopatía mediastínica. (Dai *et al.*, 2020; Hani *et al.*, 2020).

#### **9.1.15. Tratamiento**

Aunque no existe un tratamiento específico contra este virus, se están evaluando diferentes tipos de fármacos para manejar el COVID-19: antiretrovirales (lopinavir, ritonavir, ribavirina, oseltamivir, umifenovir), antivirales (cloroquina, hidroxicloroquina, mesilato de camostat), anticuperos (plasma de paciente convalescente o suero hiperinmune), antiinflamatorios (corticosteroides), terapias inmunomoduladoras (interferon  $\alpha$  y  $\beta$ , anticuerpos monoclonales contra citocinas proinflamatorias), anticoagulantes, antifibróticos, y fármacos de actividad miscelánea (nitazoxanida; Sanders *et al.*, 2020; Wiersinga *et al.*, 2020).

#### **9.1.16. Control y prevención**

Los primeros brotes de COVID-19 se intentaron controlar con medidas similares a las aplicadas para el SARS en 2003, sin embargo, estas se basaron en un sistema de detección y aislamiento de casos según signología, las cuales fracasaron ante este nuevo agente por desconocerse el rol epidemiológico de los casos asintomáticos y presintomáticos (Gandhi *et al.*, 2020). Debido a que aún no existe un tratamiento, las medidas principales de control y prevención se centran en regular la exposición a personas posiblemente infectadas, ya sea en el ámbito

personal, o desde órdenes gubernamentales: distanciamiento, higiene personal, uso de equipo de protección, rastreo de casos y contagios, cierre de escuelas y/o centros de trabajo, restricción de transporte público, cordones sanitarios, etc. (Wiersinga *et al.*, 2020).

Cerrando el 2020, algunos países han aprobado el uso de ciertas vacunas, incluyendo México, que aprobó de emergencia el uso de la vacuna Comirnaty (Pfizer-BioNTech), con una eficacia reportada del 95% (OMS, 2021<sup>a</sup>).

## **9.2. Evaluación de vacunas**

### **9.2.1. Proceso de desarrollo**

Los ensayos preclínicos comprenden la experimentación *in vitro* e *in vivo* en modelos animales, típicamente se busca caracterizar la seguridad dosis, formulación, vía de administración, inmunogenicidad y, de ser posible, protección contra el agente en desafíos controlados, se buscan además detectar posibles riesgos y aportar a la planificación de futuras pruebas en humanos (Gerdtts *et al.*, 2015; OMS, 2016).

La fase I de los estudios clínicos se lleva a cabo en pequeña escala, y su objetivo principal es establecer la tolerancia clínica y seguridad. Determina si la seguridad y reactogenicidad son aceptables, y brinda datos preliminares de inmunogenicidad (OMS, 2016).

La fase II involucra a un mayor número de participantes, busca demostrar la inmunogenicidad y el perfil de seguridad en la población objetivo, la dosis óptima, esquema inicial, duración de la inmunidad. Se deben tomar en cuenta múltiples variables asociadas a la respuesta inmune del huésped como edad, origen racial, género, etc. (OMS, 2016).

Los estudios de fase III son pruebas clínicas a larga escala para arrojar datos robustos sobre eficacia y seguridad. Al finalizar, se debe contar con suficiente evidencia clara y definitiva de que la vacuna es segura y que previene la enfermedad en cuestión, o que afecta significativamente la historia natural de la enfermedad (OMS, 2016)

Davis *et al.*, (2011) dieron seguimiento por 16 años al desarrollo de 130 vacunas profilácticas y 4,125 fármacos, al final del periodo, 85% de los productos habían fallado, 11% había tenido éxito, y el porcentaje restante seguía en desarrollo; el equipo determinó que el desarrollo de vacunas profilácticas no es significativamente diferente al desarrollo de otros fármacos en cuanto a la proporción fracaso-éxito, probabilidad de pasar a la siguiente fase de desarrollo, ni la duración de cada fase.

### **9.2.2. Pruebas preclínicas de seguridad y toxicidad**

Los estudios de toxicidad evalúan posibles efectos en órganos blanco, incluyendo sistema inmune y toxicidad sistémica. Normalmente se emplea un estudio de toxicidad en dosis repetidas que refleje el esquema clínico pretendido para humanos, administrando dosis con un adecuado margen de seguridad con relación a las dosis humanas (EMA, 1997). Tradicionalmente, el daño hepático se emplea como un indicador de toxicidad sistémica; el modelo murino suele incluir bioquímica hepática e histología de hígado (Iwalokun *et al.*, 2006; Pan *et al.*, 2018).

Para evaluar posible daño hepatocelular, se miden varias enzimas presentes en el suero, entre ellas la AST (aspartato aminotransferasa), y ALT (alanino aminotransferasa), las cuales escapan del citosol hacia la circulación, habiendo sufrido su tejido de origen algún grado de necrosis. La AST proviene de varios tejidos, entre los que destacan hígado y músculo; su nivel sérico incrementa por lesión aguda o crónica de tipo infeccioso, inflamatorio, tóxico o metabólico; pueden verse falsos aumentos por hemólisis de la muestra. La ALT proviene principalmente de músculo e hígado en rumiantes, su actividad sérica incrementa por lesión aguda (Faburay *et al.*, 2016; Jackson, 2007).

El perfil hematológico y bioquímico debe contrastarse con rangos de referencia obtenidos de una población saludable lo más parecida posible al grupo de estudio. Se recomienda que cada laboratorio establezca sus rangos de referencia, en lugar de basarse en la literatura (Russell & Roussel, 2007).

### **9.2.3. Consideraciones específicas para una vacuna contra COVID-19**

La Organización Mundial de la Salud (2020<sup>d</sup>) redactó el manual *Consideraciones para la evaluación de vacunas contra COVID-19*, en el que se incluyen los

lineamientos que debe cumplir el proceso de desarrollo de una vacuna contra COVID-19 para aprobar su uso. Los puntos concernientes a la fase preclínica son:

- **Documentación:** para iniciar las fases clínicas hace falta redactar el Documento Técnico Común del Consejo Internacional para la Armonización de Requerimientos Técnicos para Fármacos para uso Humano, mismo que debe haber sido evaluado por las autoridades nacionales regulatorias de referencia. Si se emplean adyuvantes novedosos, debe anexarse la información preclínica relevante encontrada.
- **Bio e inmunomarcadores:** se deben incluir los niveles relativos de anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes, afinidad de anticuerpos, perfil de la respuesta de células T ( $T_{H1}/T_{H2}$ ), e histopatología de pulmón (según el antígeno empleado).
- **Caracterización de la respuesta inmune:** se evalúan tres características en función del antígeno y adyuvante empleados.
  - Funcionalidad: ensayos de neutralización *in vitro*.
  - Respuesta celular: examinación de células T  $CD8^+$  y  $CD4^+$
  - Respuesta humoral: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (*ELISA*)
- **Otras consideraciones:** con base en lo encontrado durante las pruebas en animales de vacunas humanas contra otros coronavirus (SARS-CoV y MERS-CoV), las pruebas preclínicas deben tener en cuenta la posibilidad de que se produzca una cepa de COVID-19 potenciada por vacunación.

## 10. Material y métodos

Información detallada sobre los equipos, materiales, reactivos y formulación de soluciones empleadas se enlistan en el Apéndice 1 – **Equipo, materiales y soluciones**

### 10.1. Antígeno vacunal

El antígeno vacunal es una proteína quimérica recombinante en proceso de patente, que consta de varios epítomos del dominio de unión a receptor (*RBD*) de la proteína S1 del SARS-CoV-2, colocados en serie, y seguidos de una cola de polihistidinas.

#### 10.1.1. Expresión del antígeno vacunal

En antígeno vacunal se obtuvo a partir de una clona transformada de *E. coli* BL21, conteniendo un plásmido de expresión con el gen que codifica a la proteína quimérica. Se realizó un precultivo de 250 ml en caldo de lisogenia con 100 µg/ml de ampicilina, el cual se incubó 12 horas a 37 °C, con 150 rpm de agitación. El cultivo se realizó en un biorreactor, con 75 ml de preinóculo en 4 l de medio de lisogenia con ampicilina 100 µg/ml. La masa bacteriana se determinó indirectamente por espectrofotometría, monitoreando la absorbancia a 600 nm, en intervalos de 15 minutos. Al iniciar el cultivo la fase de crecimiento exponencial (correspondiente en este caso con una absorbancia de 0.35), se indujo la producción de la proteína recombinante agregando 800 mg de L-arabinosa al medio. El cultivo se finalizó a las 3 horas postinducción y la biomasa de 250 ml se colectó en tubos cilíndricos, estériles de polipropileno de 50 ml, separando y descartando el sobrenadante por centrifugación a 13,000 × *g* por 2 minutos, a 4 °C. La biomasa sedimentada se almacenó en congelación a -20 °C hasta su uso.

#### 10.1.2. Extracción

Este proceso se realizó dentro de los mismos tubos de polipropileno en los que se colectó la biomasa del cultivo. Se efectuó lisis enzimática al resuspender la biomasa en 5 ml de solución salina amortiguadora de fosfatos (SSAF), pH 7.40, estéril y agregar 500 mg de lisozima de clara de huevo, se incubó a 37 °C por 30 minutos, con 150 rpm de agitación. Luego, se provocó choque térmico mediante tres ciclos

de congelación en nitrógeno líquido y descongelación en baño maría a 56 °C, seguidos de una centrifugación 15,700 × g, a 4 °C, y descarte de sobrenadante. Después, se efectuaron tres lavados en los cuales se resuspendió el sedimento en 5 ml de SSAF estéril (pH 7.40), seguido de centrifugación a 15,700 × g, a 4 °C, y descarte del sobrenadante. Finalmente, el sedimento se resuspendió en 5 ml de solución amortiguadora A (pH 8.00)<sup>1</sup>, y se sometió a lisis mecánica por 30 minutos en agitación de vórtice con perlas de vidrio estériles, seguido de una incubación final con 150 rpm de agitación, a temperatura ambiente.

### 10.1.3. Purificación

Se llevó a cabo empleando columnas de cromatografía por afinidad a ion níquel, la cual se equilibró previamente con cuatro lavados de 4 ml de solución amortiguadora A (pH 8.00) cada uno. La columna se vació por goteo justo antes de agregar 5 ml de biomasa suspendida en solución amortiguadora A (pH 8.00), y se mezcló gentilmente con la resina de la columna, seguido de 12 horas de incubación a 4 °C en homogeneizador rotacional. Luego, se desechó por goteo contenido de la columna, y se realizaron tres lavados, consistentes cada uno en mezclar la resina con 4 ml de solución amortiguadora B (pH 6.30)<sup>1</sup>, homogeneizar por 25 minutos a 4 °C, y descartar el contenido por goteo.

Después, el contenido de la columna se eluyó por fracciones, mezclando 1 ml de solución amortiguadora C (pH 4.50)<sup>1</sup> con la resina, e incubando 1 hora a 4 °C, en homogeneizador rotacional; el contenido se recuperó en tubos estériles de polipropileno de 1.5 ml que se almacenaron a 4 °C. Las fracciones obtenidas se sometieron a electroforesis vertical en gel de poliacrilamida al 12%, 90 V por 130 minutos, para descartar aquellas con menor contenido proteico.

Finalmente, las fracciones elegidas fueron transferidas a tubos de 1.5 ml, sellados con membrana de celulosa regenerada, y se dializaron partiendo de 400 ml de urea 7.26 M estéril, manteniéndose en agitación constante y haciendo recambios cada media hora con solución amortiguadora para replegamiento (pH 7.40)<sup>1</sup> y agua

---

<sup>1</sup> Formulación descrita en el Apéndice 1.

destilada como se muestra en el **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** Al término del proceso, las fracciones fueron retransferidas a tubos de 1.5 ml y almacenadas en refrigeración a 4 °C hasta su uso.

**Cuadro 2:** Protocolo de diálisis.

Número	Solución	Recambio	
		Volumen (ml)	Concentración de urea en el medio (M)
0	Urea 7.26 M estéril	400	7.26
1		41.87	6.25
2	Sol. amortiguadora para replegamiento pH 7.40	30.76	6.0
3		33.33	5.5
4		36.36	5.0
5		40.0	4.5
6		44.44	4.0
7		50.0	3.5
8		57.14	3.0
9	Agua destilada estéril	66.66	2.5
10		80.0	2.0
11		100.0	1.5
12		133.33	1.0
13		200	0.5

#### 10.1.4. Cuantificación

Se realizó determinación total de proteína por método Bradford (Kruger, 2009) de las fracciones dializadas, usando un kit comercial de concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (*BSA*) como comparación.

#### 10.1.5. Elaboración y formulación de dosis vacunal

Cada dosis se preparó con un máximo de 72 horas previas a su aplicación, dentro de una cabina de flujo laminar nivel II, usando tubos estériles cónicos de 50 ml mantenidos en hielo; las fracciones dializadas se diluyeron en SSAF estéril (pH 7.40) para alcanzar la concentración necesaria. Luego, se añadió paulatinamente un volumen de adyuvante oleoso en rondas de 1 ml y 5 minutos de homogenización por agitación ultrasónica; la emulsión resultante se evaluó a 100x aumentos luego

de rondas de 10 minutos de agitación ultrasónica, hasta alcanzar sus micelas un tamaño promedio  $\leq 5 \mu\text{m}$ . El día de aplicación, se constató la estructura microscópica de las emulsiones preparadas, y se separaron las dosis individuales en jeringas hipodérmicas de 3 ml, 23G x 1" (Cuadro 3), las cuales fueron transportadas en refrigeración a 4 °C.

**Cuadro 3:** Formulación de dosis vacunales.

Grupo	Formulación ( $\mu\text{g}$ de proteína $\times \text{ml}^{-1}$ )	No. de Dosis
Testigos (ovinos y caprinos)	0	4 y 5
Tratamiento 1 (caprinos)	30	5
Tratamiento 2 (caprinos)	60	5
Grupo vacunado (ovinos)	100	4 y 5
Tratamiento 3 (caprinos)		

## 10.2. Evaluación de seguridad e inmunogenicidad de la vacuna en ovinos

### 10.2.1. Selección de individuos

Antes de integrarse al estudio, los candidatos ovinos fueron evaluados mediante una *ELISA* indirecta para el diagnóstico de COVID-19, que detecta anticuerpos contra el dominio de unión a receptor (*RBD*) de la proteína S1 del SARS-CoV-2, en el cual está basado el antígeno vacunal. Para el ensayo se empleó como antígeno un péptido sintético en proceso de patente; los controles positivo y negativo fueron sueros humanos de pacientes diagnosticados por pruebas diagnósticas oficiales, previamente estandarizados para su uso en esta *ELISA*<sup>2</sup>; se adicionó un control de conjugado para ovino y otro para humano.

El experimento se realizó en placas de poliestireno de 96 pozos, evaluando cada individuo por triplicado. Primero, las placas fueron tamizadas con 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de péptido disuelto en solución amortiguadora de carbonatos, pH 9.60 (100  $\mu\text{l}/\text{pozo}$ ), e incubadas 12 horas a 4 °C. Luego de tres lavados con solución de lavado (200  $\mu\text{l}/\text{pozo}$ ), se bloqueó con solución de bloqueo (200  $\mu\text{l}/\text{pozo}$ ), una hora a 37 °C, con

<sup>2</sup> La formulación de soluciones, detalles de los equipos, anticuerpos y reactivos empleados se enlistan en el Apéndice 1.

200 rpm de agitación. Luego de tres lavados con solución de lavado (200 µl/pozo), se agregó el suero de cada ejemplar 1:80 en solución diluyente (100 µl/pozo) y se incubó una hora a 37 °C, con 200 rpm de agitación. Luego de tres lavados con solución de lavado (200 µl/pozo), se agregó el anticuerpo secundario 1:3000 en solución diluyente (100 µl/pozo), y se incubó una hora a 37 °C, con 200 rpm de agitación. Luego de tres lavados con solución de lavado (200 µl/pozo), se agregó la solución de revelado (100 µl/pozo), se incubó 25 minutos a temperatura ambiente sin luz, y se obtuvo la densidad óptica de la placa a 450 nm.

Para la interpretación de los resultados se determinó un punto de corte consistente en el promedio del triplicado de la densidad óptica del control negativo, más tres desviaciones estándar, diagnosticándose como «positivos» aquellas muestras con densidad óptica igual o mayor al punto de corte.

Los animales seleccionados fueron negativos a la prueba, y se distribuyeron aleatoriamente en los grupos experimentales. La homogeneidad de cada grupo se confirmó con base indicadores estadísticos descriptivos del peso vivo de los ejemplares (promedio, desviación estándar, y valores máximo y mínimo).

### **10.2.2. Conformación de grupos**

Ocho ovinos machos de raza Blackbelly, de cuatro meses de edad al inicio del experimento, nacidos en el campus Amazcala de la Facultad de Ciencias Naturales, de la Universidad Autónoma de Querétaro, fueron distribuidos en dos grupos de cuatro individuos cada uno: un grupo vacunado grupo testigo. La identificación de los ejemplares se obtuvo mediante un código compuesto de tres claves:

- a) Clave de especie: letra «B» para ovinos.
- b) Grupo de tratamiento: representado por un collar de fleje plástico de color; amarillo (A) para el grupo testigo, y azul (Az) para el grupo vacunado.
- c) Número dentro del grupo: representado por una grapa metálica marcada en el collar, se asignó un número consecutivo del 1 al 4 para cada individuo dentro de cada grupo.

El día 0 se obtuvo peso vivo, temperatura corporal basal, tamaño basal de linfonodos preescapulares, y una muestra de suero preinmune.

### 10.2.3. Inmunización

Cada ejemplar recibió una dosis subcutánea de 1 ml en la región lateral izquierda del cuello el día 0 y en la región contralateral el día 21, previa antisepsia del sitio con cloruro de benzalconio y etanol al 70%. El grupo vacunado recibió 100 µg de proteína emulsionada con adyuvante y el grupo control recibió SSAF (pH 7.40) emulsionada con adyuvante.

### 10.2.4. Seguridad

La seguridad en ensayos de vacunación en ovinos suele enfocarse en la temperatura corporal, reacción en el sitio de aplicación y patología clínica en menor medida (Boumart *et al.*, 2019; Chandran *et al.*, 2010; Desclozeaux *et al.*, 2019; Faburay *et al.*, 2016; Gauci *et al.*, 2007; Soi *et al.*, 2010), para el presente estudio se consideraron además estado general (actitud, comportamiento, condición corporal y aspecto clínico), reactividad de linfonodos regionales, un hemograma completo y ganancia diaria de peso.

- **Estado general:** arroja datos sobre la presencia, grado y duración de estados de afección, y brinda datos sobre los posibles sistemas orgánicos implicados.
  - **Actitud o postura:** evaluada por inspección según lo propuesto por Ramírez (2008) y Pacheco (1991), puede indicar la presencia de estímulos dolorosos.
  - **Comportamiento:** evaluado por inspección según lo propuesto por Ramírez (2008) y Pacheco (1991), toda anomalía en el comportamiento de los animales debe considerarse de importancia clínica, y justifica una investigación posterior, siendo las causas más comunes las de origen doloroso.
  - **Condición corporal:** evaluada según lo propuesto por Dwyer *et al.* (2015) en una escala del 1 al 5.
  - **Aspecto clínico:** evaluado por inspección según lo propuesto por Ramírez (2008) y Pacheco (1991), indica estados momentáneos de salud o enfermedad, y en este caso, un posible malestar agudo relacionado a la vacunación.
- **Temperatura corporal:** la temperatura rectal suele emplearse como un indicativo de la temperatura interna del cuerpo, esta se ve elevada de forma

patológica por infecciones virales o bacterianas, septicemia, inflamación de tejidos, entre otras (Ramírez, 2008; Pacheco, 1991), el límite superior en ovinos es de 39.5 °C (González, 2018).

- **Reactividad de linfonodos regionales:** se evaluaron los linfonodos preescapulares ya que estos reciben el drenaje linfático de la región en que se administró la vacuna. El monitoreo consistió en medir con vernier las dimensiones del linfonodo, y dolor a la palpación. Se considera reactividad leve cuando el tamaño del linfonodo afectado supera su tamaño original en 1.5 veces, reactividad moderada al superarlo por hasta dos veces, y reactividad severa al superar por más del doble (Ramírez, 2008).
- **Reacción en el sitio de aplicación:** los días 0, 1, 2, 3, 21, 22, 23, 24, y 31, se buscaron reacciones postvacunales locales mediante inspección y palpación, y se determinó su extensión por medición con vernier.
- **Enzimas hepáticas:** los días 0, 10, 21 y 31, se evaluó la actividad sérica de las enzimas AST y ALT mediante kits comerciales, siguiendo las especificaciones del fabricante.
- **Ganancia diaria de peso (GDP):** se estimó individualmente a partir del peso vivo al día 0 PV ( $PV_{d0}$ ), y el peso vivo al día 31 PV ( $PV_{d31}$ ), mediante la siguiente ecuación (González *et al.* 2014):

$$GDP \text{ (g/día)} = 1000 \frac{PV_{d31} \text{ (kg)} - PV_{d0} \text{ (kg)}}{31 \text{ (días)}}$$

#### 10.2.5. Inmunogenicidad

Los días 0, 10, 21 y 31, se extrajeron 10 ml de sangre venosa de la yugular mediante sistema Vacutainer®. El suero se separó por centrifugación a 1,600 × g por 10 minutos, se alicuotó en muestras de 1 ml, en tubos de polipropileno de 1.5 ml, y se almacenó en congelación a -20 °C hasta su uso.

Se realizó determinación de la presencia de anticuerpos en placas de poliestireno de 96 pozos, evaluando un grupo experimental por placa, con una muestra de cada sangrado por triplicado. Primero, las placas fueron tamizadas con 0.4 µg/ml de proteína vacunal disuelta en solución amortiguadora de carbonatos pH 9.60 (100

µl/pozo), e incubadas 12 horas a 4 °C. Luego de tres lavados con solución de lavado (200 µl/pozo), se bloqueó con solución de bloqueo (200 µl/pozo), una hora a 37 °C, con 200 rpm de agitación. Luego de tres lavados con solución de lavado (200 µl/pozo), se agregó el suero de cada ejemplar 1:2000 en solución diluyente (100 µl/pozo) y se incubó una hora a 37 °C, con 200 rpm de agitación. Luego de tres lavados con solución de lavado (200 µl/pozo), se agregó el anticuerpo secundario 1:3000 en solución diluyente (100 µl/pozo), y se incubó una hora a 37 °C, con 200 rpm de agitación. Luego de tres lavados con solución de lavado (200 µl/pozo), se agregó la solución de revelado (100 µl/pozo), se incubó 25 minutos a temperatura ambiente sin luz, y se obtuvo la densidad óptica de la placa a 450 nm.

Los análisis estadísticos se realizaron empleando el programa computacional GraphPad Prism. Las densidades ópticas obtenidas de cada día de la determinación de los dos grupos se compararon mediante pruebas *t* de Student con  $\alpha = 0.05$ , sosteniendo la hipótesis nula de que no existe diferencia estadística entre los grupos.

### **10.3. Evaluación de seguridad e inmunogenicidad de la vacuna en caprinos**

#### **10.3.1. Selección de individuos**

Antes de integrarse al estudio, los candidatos caprinos fueron evaluados mediante una ELISA indirecta para el diagnóstico de COVID-19, que detecta anticuerpos contra el dominio de unión a receptor (RBD) de la proteína S1 del SARS-CoV-2, en el cual está basado el antígeno vacunal. Para el ensayo se empleó como antígeno un péptido sintético en proceso de patente; los controles positivo y negativo fueron sueros humanos de pacientes diagnosticados por pruebas diagnósticas oficiales, previamente estandarizados para su uso en esta *ELISA*<sup>33</sup>; se adicionó un control de conjugado para caprino y otro para humano.

El experimento se realizó en placas de poliestireno de 96 pozos, evaluando cada individuo por triplicado. Primero, las placas fueron tamizadas con 10 µg/ml de

---

<sup>33</sup> La formulación de soluciones, detalles de los equipos, anticuerpos y reactivos empleados se enlistan en el Apéndice 1.

péptido disuelto en solución amortiguadora de carbonatos pH 9.60 (100 µl/pozo), e incubadas 12 horas a 4 °C. Luego de tres lavados con solución de lavado (200 µl/pozo), se bloqueó con solución de bloqueo (200 µl/pozo), una hora a 37 °C, con 200 rpm de agitación. Luego de tres lavados con solución de lavado (200 µl/pozo), se agregó el suero de cada ejemplar 1:80 en solución diluyente (100 µl/pozo) y se incubó una hora a 37 °C, con 200 rpm de agitación. Luego de tres lavados con solución de lavado (200 µl/pozo), se agregó el anticuerpo secundario 1:3000 en solución diluyente (100 µl/pozo), y se incubó una hora a 37 °C, con 200 rpm de agitación. Luego de tres lavados con solución de lavado (200 µl/pozo), se agregó la solución de revelado (100 µl/pozo), se incubó 25 minutos a temperatura ambiente sin luz, y se obtuvo la densidad óptica de la placa a 450 nm.

Para la interpretación de los resultados se determinó un punto de corte consistente en el promedio del triplicado de la densidad óptica del control negativo, más tres desviaciones estándar, diagnosticándose como «positivos» aquellas muestras con densidad óptica igual o mayor al punto de corte.

Los animales seleccionados fueron negativos a la prueba, y se distribuyeron aleatoriamente en los grupos experimentales. La homogeneidad de cada grupo se confirmó con base indicadores estadísticos descriptivos del peso vivo de los ejemplares (promedio, desviación estándar, y valores máximo y mínimo).

### **10.3.2. Conformación de grupos**

Veinte caprinos hembra, de razas Alpino francés, y craza de Murciano-Granadino, de entre siete y ocho meses de edad al inicio del experimento, nacidas en el campus Amazcala, de la Facultad de Ciencias Naturales, de la Universidad Autónoma de Querétaro, fueron distribuidas en cuatro grupos de cinco individuos cada uno: tres grupos vacunados que recibieron 30, 60 y 100 µg de proteína, y grupo testigo que recibió SSAF (pH 7.40) y adyuvante. La identificación de los ejemplares se obtuvo mediante un código compuesto de tres claves:

- a) Clave de especie: letra «C» para caprinos.

- b) Grupo de tratamiento: representado por un collar de fleje plástico de color; negro (N) para el grupo testigo, gris (G) para el tratamiento 1, amarillo (A) para el tratamiento 2 y azul (Az) para el tratamiento 3.
- c) Número dentro del grupo: representado por una grapa metálica marcada en el collar, se asignó un número consecutivo del 0 al 4 para cada individuo dentro de cada grupo.

El día 0 se obtuvo peso vivo, temperatura corporal basal, tamaño basal de linfonodos preescapulares, y una muestra de suero preinmune.

### 10.3.3. Inmunización

Cada ejemplar recibió una dosis subcutánea de 1 ml en la región lateral izquierda del cuello el día 0 y en la región contralateral el día 21, previa antisepsia del sitio con cloruro de benzalconio y etanol al 70%.

### 10.3.4. Seguridad

La seguridad en ensayos de vacunación con adyuvante oleoso en caprinos suele enfocarse en la temperatura corporal, reacción en el sitio de aplicación, y toxicidad y patología clínica en menor medida (Martínez *et al.*, 1996; Mendes *et al.*, 2010; Patil *et al.*, 2002), para el presente estudio se consideraron además estado general (actitud, comportamiento, condición corporal y aspecto clínico), reactividad de linfonodos regionales, un hemograma completo y ganancia diaria de peso.

- **Estado general:** arroja datos sobre la presencia, grado y duración de estados de afección, y brinda datos sobre los posibles sistemas orgánicos implicados.
  - **Actitud o postura:** evaluada por inspección según lo propuesto por Ramírez (2008) y Pacheco (1991), puede indicar la presencia de estímulos dolorosos.
  - **Comportamiento:** evaluado por inspección según lo propuesto por Ramírez (2008) y Pacheco (1991), toda anomalía en el comportamiento de los animales debe considerarse de importancia clínica, y justifica una investigación posterior, siendo las causas más comunes las de origen doloroso.
  - **Condición corporal:** evaluado según lo propuesto por Stilwell *et al.* (2015) en escala del 1 al 3.

- **Aspecto clínico:** evaluado por inspección según lo propuesto por Ramírez (2008) y Pacheco (1991), indica estados momentáneos de salud o enfermedad, y en este caso, un posible malestar agudo relacionado a la vacunación.
- **Temperatura corporal:** la temperatura rectal suele emplearse como un indicativo de la temperatura interna del cuerpo, viéndose elevada de forma patológica por infecciones virales o bacterianas, septicemia, inflamación de tejidos, entre otras (Ramírez, 2008; Pacheco, 1991), el límite superior en caprinos es de 40.3 °C (González, 2018).
- **Reactividad de linfonodos regionales:** se evaluaron los linfonodos preescapulares ya que estos reciben el drenaje linfático de la región en que se administró la vacuna. El monitoreo consistió en medir con vernier las dimensiones del linfonodo, y dolor a la palpación. Se considera reactividad leve cuando el tamaño del linfonodo afectado supera su tamaño original en 1.5 veces, reactividad moderada al superarlo por hasta dos veces, y reactividad severa al superar por más del doble (Ramírez, 2008).
- **Reacción en el sitio de aplicación:** los días 0, 1, 2, 3, 21, 22, 23, 24, y 31, se buscaron reacciones postvacunales locales mediante inspección y palpación, y se determinó su extensión por medición con vernier.
- **Enzimas hepáticas:** los días 0, 10, 21 y 31, se evaluó la actividad sérica de las enzimas AST y ALT mediante kits comerciales, siguiendo las especificaciones del fabricante.
- **Ganancia diaria de peso (GDP):** se estimó a partir del peso vivo (PV) en tres intervalos (del inicio del experimento al día 31, del día 31 al día 50, y del inicio al día 50) mediante la siguiente ecuación, según González *et al.* (2014):

$$\text{GDP (g/día)} = 1000 \frac{\text{PV}_2 \text{ (kg)} - \text{PV}_1 \text{ (kg)}}{\text{días}}$$

### 10.3.5. Inmunogenicidad

Los días 0, 10, 21, 31 y 50, se extrajeron 10 ml de sangre venosa de la yugular mediante sistema Vacutainer®, el suero se separó por centrifugación a 1,600 × g

por 10 minutos, se alicuotó en muestras de 1 ml en tubos de polipropileno 1.5 ml, y se almacenó en congelación a -20 °C hasta su uso.

Se realizó determinación de la presencia de anticuerpos en placas de poliestireno de 96 pozos, evaluando un grupo experimental por placa, con una muestra de cada sangrado por triplicado. Primero, las placas fueron tamizadas con 0.4 µg/ml de proteína vacunal disuelta en solución amortiguadora de carbonatos pH 9.60 (100 µl/pozo), e incubadas 12 horas a 4 °C. Luego de tres lavados con solución de lavado (200 µl/pozo), se bloqueó con solución de bloqueo (200 µl/pozo), una hora a 37 °C, con 200 rpm de agitación. Luego de tres lavados con solución de lavado (200 µl/pozo), se agregó el suero de cada ejemplar 1:2000 en solución diluyente (100 µl/pozo) y se incubó una hora a 37 °C, con 200 rpm de agitación. Luego de tres lavados con solución de lavado (200 µl/pozo), se agregó el anticuerpo secundario 1:3000 en solución diluyente (100 µl/pozo), y se incubó una hora a 37 °C, con 200 rpm de agitación. Luego de tres lavados con solución de lavado (200 µl/pozo), se agregó la solución de revelado (100 µl/pozo), se incubó 25 minutos a temperatura ambiente sin luz, y se obtuvo la densidad óptica de la placa a 450 nm.

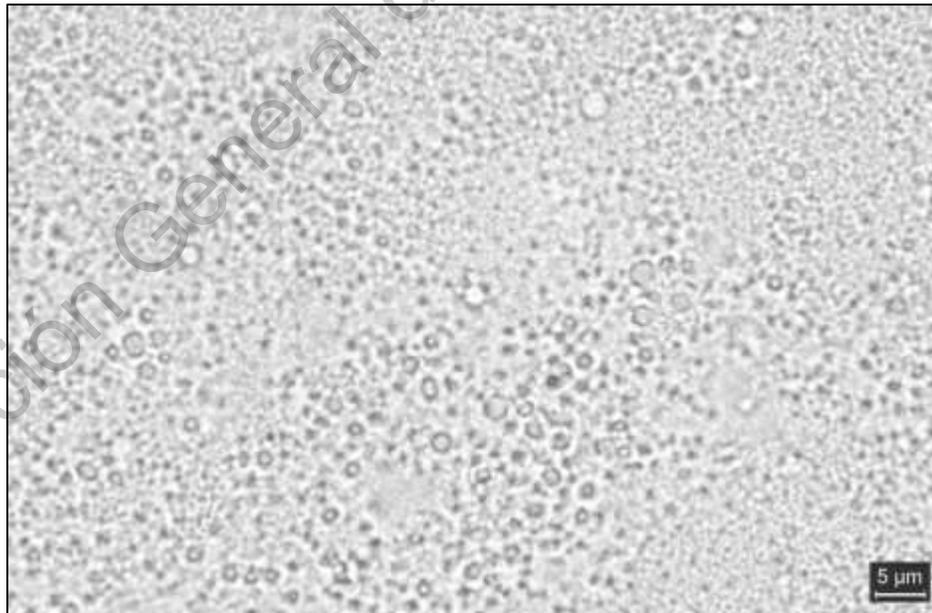
#### **10.4. Determinación de dosis vacunal**

Los análisis estadísticos se realizaron empleando el programa computacional GraphPad Prism. Se compararon los cuatro grupos caprinos en cada día de la determinación de anticuerpos mediante análisis de varianza unidireccional y prueba *post hoc* Tukey, ambos con  $\alpha=0.05$ , sosteniendo la hipótesis nula de que no existe diferencia entre los grupos.

## 11. Resultados y discusión

### 11.1. Obtención del antígeno vacunal

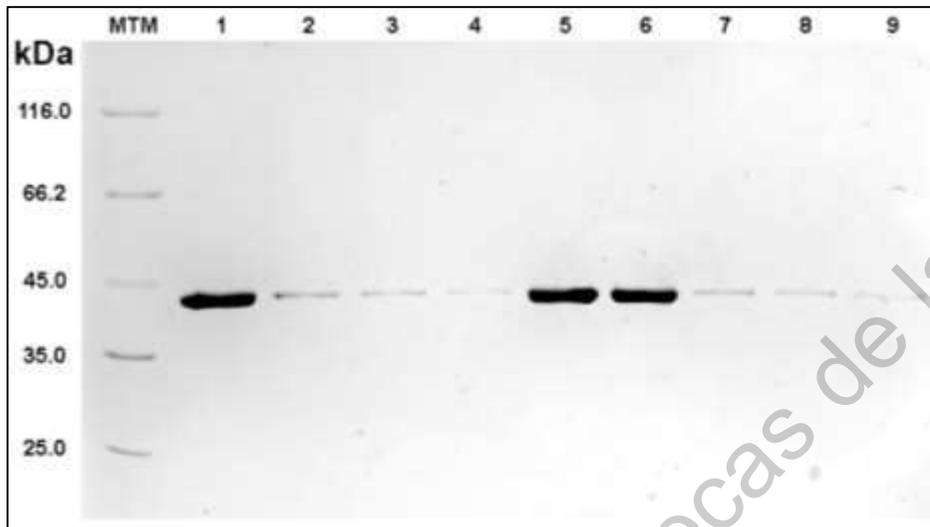
La proteína recombinante fue purificada y cuantificada antes de ser utilizada en la primera inmunización. De la biomasa sedimentada de 500 ml de cultivo sometida a extracción y purificación, se eluyeron veintitrés fracciones, de las cuales, ocho se seleccionaron para diálisis según su pureza, integridad y concentración aparente por electroforesis vertical, tres de estas se seleccionaron con base a su concentración de proteína total según método de Bradford para elaborar las dosis vacunales (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). El antígeno vacunal para la segunda inmunización se obtuvo a partir de la biomasa de 500 ml de cultivo sometidos a extracción y purificación. Se eluyeron veintiséis fracciones, de las cuales, nueve fueron seleccionadas para dializar con base en su pureza, integridad y concentración aparente por electroforesis vertical, cuatro de ellas se seleccionaron con base a su concentración de proteína total según método de Bradford, para elaboración de las dosis vacunales. Finalmente, tres fracciones se seleccionaron como antígeno para los análisis por *ELISA* indirecta, debido a su



**Figura 1:** Microfotografía de vacuna emulsionada.

Vista a 100x aumentos de la emulsión de la proteína vacunal con el adyuvante oleoso 1:1. La emulsión está lista al medir sus micelas menos de 5 µm.

pureza e integridad determinada por electroforesis vertical. (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).



**Figura 2:** Pureza e integridad de la proteína recombinante empleada como antígeno vacunal.

Electroforesis vertical en gel de poliacrilamida al 12% teñido con azul de Coomassie; se aprecian fracciones eluidas de la proteína recombinante, la cual pesa aproximadamente 45 kDa. Las fracciones de los carriles 1, 5 y 6 fueron elegidas para someterse a diálisis. **MTM:** Marcador de talla molecular; **1:** fracción 23-12; **2:** fracción 23-13; **3:** fracción 23-14; **4:** fracción 23-15; **5:** fracción 28-16; **6:** fracción 28-17; **7:** fracción 28-18; **8:** fracción 28-19; **9:** fracción 28-20.

Aunque la literatura indica que la purificación de proteínas mediante cromatografía por afinidad a iones metálicos tiene un alto rendimiento de recuperación de proteínas recombinantes con polihistidinas expresadas en *E. coli* (Bornhorst & Falke, 2000), se sabe que es necesario ajustar las condiciones de purificación (método de lisado celular, pH de soluciones amortiguadoras, concentración de imidazol, etc.) conforme las características de cada proteína, para obtener el mayor rendimiento posible (Magnusdottir *et al.*, 2009). Las soluciones amortiguadoras empleadas en la purificación del antígeno vacunal se diseñaron partiendo de las características teóricas predichas *in silico* del mismo, no obstante, experimentos complementarios como la determinación del punto isoeléctrico pueden ayudar a mejorar el diseño de las soluciones amortiguadoras para obtener mejor rendimiento en purificaciones futuras de la misma proteína.

Los adyuvantes oleosos se emplean en varias vacunas de emulsiones agua-aceite aprobadas para uso humano y veterinario, (Dominoswki *et al.*, 2004), el adyuvante oleoso empleado en este experimento se utiliza en proporción diferente a lo reportado en la literatura: 1:1 antígeno-adyuvante, contra 3:7 (Jang *et al.*, 2011; Jang *et al.*, 2013; Arous *et al.*, 2013; Klimka *et al.*, 2015); lo que puede afectar las características miscelares, factor determinante en la estabilidad, carga antigénica, perfil de liberación, biodisponibilidad, e inmunogenicidad de la mezcla, alcanzando una máxima eficacia con tamaños micelares uniformes de entre 2 y 8  $\mu\text{m}$  (Wu *et al.*, 2015).

Otro punto a tener en cuenta es la necesidad de emplear lotes uniformes de antígeno en los experimentos de vacunación. Para futuros ensayos, puede buscarse purificar un lote de antígeno suficiente para toda la prueba, y emulsionar todas las dosis de una sola vez, con alternativas de emulsión que generen micelas pequeñas y uniformes de manera consistente y confiable, ya que esto favorece la estabilidad de la mezcla en el tiempo (Dominoswki *et al.*, 2004).

## **11.2. Evaluación de seguridad e inmunogenicidad en ovinos**

### **11.2.1. Seguridad**

Ya que toda vacuna está diseñada para estimular el sistema inmune, es necesario tener mente que su aplicación está asociada a ciertos efectos secundarios como fiebre, enrojecimiento, hinchazón y/o dolor en el sitio de aplicación, generalmente el cuadro es leve y se presenta en las primeras 72 horas, desapareciendo algunos días después (Freund, 2021).

- **Estado general**

- **Actitud o postura:** todos los individuos presentaron actitud «normal» a lo largo de todo el experimento, caracterizada por la posición anatómica libremente adoptada de los ojos, orejas, extremidades, cabeza, cuello y cola, con relación al tronco (Ramírez, 2008; Pacheco, 1991).
- **Comportamiento:** todos los individuos presentaron un comportamiento «normal», caracterizado por la forma típica de reaccionar a los estímulos

del medio (ausencia de depresión, apatía, intranquilidad, furor, etcétera; Ramírez, 2008; Pacheco, 1991).

- **Condición corporal:** todos los individuos se mantuvieron con condición corporal de 3, «bueno», a lo largo de todo el experimento, caracterizada por procesos espinosos palpables como pequeñas elevaciones suaves y redondeadas, vértebras individuales solo perceptibles bajo presión, procesos transversos suaves y bien cubiertos, ojo de chuleta lleno y con moderada cobertura de grasa. Descensos en la condición corporal indican estados de afección crónicos (Dwyer *et al.*, 2015).
- **Aspecto clínico:** todos los individuos presentaron un aspecto clínico «normal» a lo largo de todo el experimento, caracterizada por una impresión externa saludable (Ramírez, 2008; Pacheco, 1991).

Los individuos se mantuvieron en buen estado general a lo largo de todo el experimento, las inmunizaciones no tuvieron efecto alguno sobre el aspecto clínico, estado de carnes, comportamiento, ni actitud.

- **Temperatura corporal:** se observó incremento leve y transitorio de la temperatura rectal en algunos ejemplares luego de la primera inmunización (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).
  - Grupo testigo: tres individuos se presentaron en el límite superior durante el segundo día luego de la primera inmunización; ningún ejemplar presentó fiebre luego de la segunda inmunización.
  - Grupo vacunado: un individuo presentó fiebre el primer día luego a la primera inmunización (0.7 °C sobre el límite superior) y se mantuvo al límite superior durante el segundo día; otro individuo presentó fiebre durante el segundo día posterior a la primera inmunización (0.4 °C sobre el límite superior); ningún ejemplar presentó fiebre luego de la segunda inmunización.

**Cuadro 4:** Temperatura rectal postvacunación en ovinos.

Grupo	ID ovino	1ra inmunización				2da inmunización		
		D 0	D 1	D 2	D 3	D 21	D 22	D 23
Testigo	BA1	39.1	38.7	39.0	38.7	37.9	38.8	39.3

	<b>BA2</b>	38.6	38.9	<b>39.5</b>	39.2	38.2	38.9	38.9
	<b>BA3</b>	38.8	39.2	<b>39.5</b>	39.0	38.3	39.0	38.6
	<b>BA4</b>	39.2	39.1	<b>39.5</b>	38.8	38.7	39.0	39.2
<b>Vacunado</b>	<b>BAz1</b>	39.3	38.9	39.2	39.3	38.5	39.1	38.8
	<b>BAz2</b>	39.2	39.3	<b>39.9</b>	39.1	38.2	38.6	39.3
	<b>BAz3</b>	39.3	<b>40.2</b>	<b>39.5</b>	38.9	38.7	39.2	39.1
	<b>BAz4</b>	39.3	39.3	39.4	39.3	38.1	38.3	38.8

Los valores se presentan en °C. Límite superior de 39.5 °C (González, 2018). D: día.

Se considera incremento «leve» cuando la temperatura rebasa hasta por 1 °C el límite superior (Ramírez, 2008). En el estudio de vacunación llevado a cabo por Zhugunissoff *et al.*, (2018) donde se empleó el mismo adyuvante que en el presente trabajo, se encontró fiebre postvacunal en algunos de los animales, tanto en el grupo control como en el tratado. El incremento observado tanto en el grupo control como en el tratado del presente trabajo puede reflejar una reacción al adyuvante empleado, o alguna causa externa ajena al experimento.

- **Reactividad de linfonodos regionales:** la tumefacción de los linfonodos ocurre principalmente como una respuesta defensiva a patógenos, al desatarse la proliferación de células inmunes dentro de ellos (González, 2018). Se observó reactividad leve y moderada del LNR del primer sitio de aplicación en algunos animales, únicamente luego de la primera inmunización (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).
  - Grupo testigo: diez días luego de la primera inmunización, se observó reactividad leve del LNR del primer sitio de aplicación en un único ejemplar. No se observó reactividad del LNR del segundo sitio de aplicación.
  - Grupo vacunado: diez días luego de la primera inmunización, se observó reactividad del LNR del primer sitio de aplicación en todo el grupo, mitad de los individuos con reactividad leve, y mitad con reactividad moderada. No se observó reactividad del LNR del segundo sitio de aplicación.

**Cuadro 5:** Reactividad de linfonodos regionales en ovinos.

Grupo	ID ovino	Tamaño LNR 1r sitio (mm)			Tamaño LNR 2do sitio (mm)	
		D 0	D 10	D 31	D 21	D 31
Control	BA1	16	16	17	21	18
	BA2	16	16	15	20	18
	BA3	14	17	15	17	14
	BA4	18	<b>26*</b>	19	20	17
Tratado	BAz1	15	<b>28**</b>	15	19	17

<b>BAz2</b>	15	<b>23*</b>	17	27	21
<b>BAz3</b>	15	<b>29**</b>	21	21	17
<b>BAz4</b>	18	<b>27*</b>	20	13	20

D: día. LNR: linfonodo regional; (\*): reactividad leve; (\*\*) reactividad moderada.

No resulta sorprendente descubrir tumefacción de los LNR en el grupo tratado, ya que esta está asociada con procesos inmunológicos (Ramírez, 2008). El ejemplar del grupo testigo que presentó reactividad leve del LNR pudo haberlo presentado ya sea por alguna alteración no relacionada, o por una inoculación no estéril de su dosis vacunal.

- **Reacción en el sitio de aplicación:** se encontraron reacciones postvacunales leves y moderadas en el sitio de aplicación, de aproximadamente cinco días de duración, siendo más común la reacción inflamatoria luego de la primera inmunización, y el edema luego de la segunda (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).
  - Grupo control: luego de la primera inmunización, solo un individuo presentó inflamación en el sitio de aplicación, con una duración de tres días. Luego de la segunda inmunización, todos los individuos presentaron edema subcutáneo, con una duración promedio de cuatro días, de 27 x 34 mm de extensión inicial promedio.
  - Grupo tratado: dos individuos presentaron inflamación en el sitio de aplicación tras la primera inmunización, con 17 x 21 mm de extensión inicial promedio, y ambos de dos días de duración. Todos los individuos presentaron edema subcutáneo luego de la segunda inmunización, con una duración promedio de dos días, de 18 x 20 mm de extensión inicial promedio; solo un individuo presentó inflamación del sitio de aplicación, de 17 x 19 mm y un día de duración.

**Cuadro 6:** Reacciones locales postvacunación en ovinos.

Grupo	ID ovino	1ra inmunización				2da inmunización				
		D 1	D 2	D 3	D4	D 22	D 23	D 24	D 25	D26
Control	BA1	—	—	—	—	—	Ede. 32 x 37	Ede. 17 x 14	Ede. 8 x 7	—
	BA2	—	—	—	—	Ede. 10 x 12	—	—	—	—
	BA3	—	—	—	—	Ede. 31 x 48	Ede. 21 x 28	Ede. 16 x 20	Ede. 11 x 12	—

	<b>BA4</b>	Inf. 20 x 35	Infl. 23 x 38	Infl.17 x 20	—	Ede. 32 x 40	Ede. 21 x 26	Ede. 12 x 15	Ede. 6 x 7	—
<b>Tratado</b>	<b>BAz1</b>	—	—	—	—	Infl. 17 x 19	Ede. 24 x 26	Ede. 10 x 10	—	—
	<b>BAz2</b>	—	Infl. 19 x 21	Infl. 9 x 12	—	—	Ede. 28 x 32	Ede. 18 x 18	—	—
	<b>BAz3</b>	—	Infl. 15 x 20	Infl. 8 x 10	—	—	Ede. 12 x 10	—	—	—
	<b>BAz4</b>	—	—	—	—	—	Ede. 10 x 13	—	—	—

Los valores se presentan en mm. D: día Infl.: inflamación; Ede: edema; (—): sin reacción.

Algunos autores han encontrado inflamación leve como reacción postvacunal en el sitio de aplicación en ovinos (Soi *et al.*, 2010), siendo particularmente interesantes los hallazgos de Faburay *et al.* (2016) y Zhugunissov *et al.* (2018), quienes habiendo inmunizado ovejas con adyuvante oleoso de la misma marca empleada en este estudio, encontraron una leve «hinchazón» e inflamación del sitio luego de la aplicación, misma que atribuyeron a un depósito subcutáneo de la dosis. La incidencia de estas reacciones en el grupo control sugiere un posible papel del adyuvante, cuando se usa alto porcentaje de aceite en la mezcla, se produce un depósito duradero en el sitio de aplicación, que suele producir inflamación y reacción local significativa (Dominoswki *et al.*, 2004).

- **Enzimas hepáticas:** de todas las mediciones realizadas en todos los ejemplares, solo un individuo del grupo tratado exhibió un incremento leve en la actividad sérica de ALT el día 21, ningún ejemplar presentó incremento en la actividad sérica de AST. El incremento en cuestión no puede asociarse con la segunda inmunización, debido a que la muestra fue tomada previo a la administración de la dosis vacunal; pese a la falta de medición de enzimas musculares, el nulo incremento en la actividad sérica de AST y el poco incremento en la actividad sérica de ALT (diez unidades por litro sobre el límite superior; Aiello & Moses, 2016) hacen que el origen hepático del incremento sea poco probable, y de poca importancia para el ensayo.

- **Hemograma completo:** se encontró trombocitopenia leve en todo el grupo tratado, y en un individuo del grupo control (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

**Cuadro 7:** Hemograma completo de ovinos.

Parámetro	Unidades	Rango	Grupo control				Grupo tratado			
			BA1	BA2	BA3	BA4	BAz1	BAz2	BAz3	BAz4
VCA	%	27 – 45	43	44.1	<b>46.5</b>	39.3	42.5	42.9	42.3	<b>46.8</b>
Hgb	g/dl	9 – 15	14.3	14.7	<b>15.3</b>	12.7	14.6	14.7	13.9	<b>15.4</b>
CMHC	g/dl	31 – 34	33.3	33.3	32.9	32.3	<b>34.4</b>	<b>34.3</b>	32.9	32.9
Plaquetas	$\times 10^9 / l$	800 – 1100	826	<b>791</b>	837	824	<b>731</b>	<b>771</b>	<b>742</b>	<b>740</b>
LT	$\times 10^9 / l$	4 – 8	<b>13.7</b>	<b>8.2</b>	<b>14.1</b>	<b>16.5</b>	<b>9.3</b>	<b>14.6</b>	<b>9.6</b>	<b>10.5</b>
Neutrófilos	%	10 – 50	43	34	34	49	44	42	48	33
	$\times 10^9 / l$	0.7 – 6	5.9	2.8	4.8	8.1	4.1	<b>6.1</b>	4.6	3.5
Bandas	%	0 – 0	0	0	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	0
	$\times 10^9 / l$	—	0	0	0.3	0.2	0.1	0.1	0.1	0
Linfocitos	%	40 – 55	53	<b>61</b>	<b>60</b>	39	53	54	45	<b>63</b>
	$\times 10^9 / l$	2 – 9	7.3	5	8.5	6.4	4.9	7.9	4.3	6.6
Monocitos	%	0 – 6	0	1	2	1	0	2	2	1
	$\times 10^9 / l$	0 – 0.75	0	0.1	0.3	0.2	0	0.3	0.2	0.1
Eosinófilos	%	0 – 10	4	4	2	10	2	1	4	3
	$\times 10^9 / l$	0 – 1	0.5	0.3	0.3	<b>1.7</b>	0.2	0.1	0.4	0.3
Basófilos	%	0 – 3	0	0	0	0	0	0	0	0
	$\times 10^9 / l$	0 – 0.3	0	0	0	0	0	0	0	0

Valores de referencia obtenidos de Aiello & Moses (2016). VCA: volumen celular aglomerado; Hgb: hemoglobina; CMHC: concentración media de hemoglobina corpuscular; LT: leucocitos totales.

El hemograma completo arrojó la presencia de trombocitopenia, principalmente en los individuos del grupo tratado, no obstante, todos los individuos exhibieron un conteo plaquetario cercano al límite inferior del rango empleado, habiéndose encontrado a todos los individuos aparentemente sanos, y sin posibilidad de inspeccionar el frotis sanguíneo, queda la interrogante de si esta alteración se debe al criterio empleado, si es un artefacto de aglutinación plaquetaria, o tiene significancia clínica (Jackson, 2005).

- **Ganancia diaria de peso:** sirve como un indicador del desarrollo en animales jóvenes (González, 2018), y se ha empleado para medir la reducción en la tasa de crecimiento causada por estados de afección en ovinos (Nieuwhof *et al.*, 2008). Al término del experimento, la ganancia diaria de peso de ambos grupos no presentó diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ; ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.), por lo que se infiere que las inmunizaciones no tuvieron efecto sobre la tasa de crecimiento.

**Cuadro 8:** Ganancia diaria de peso en ovinos.

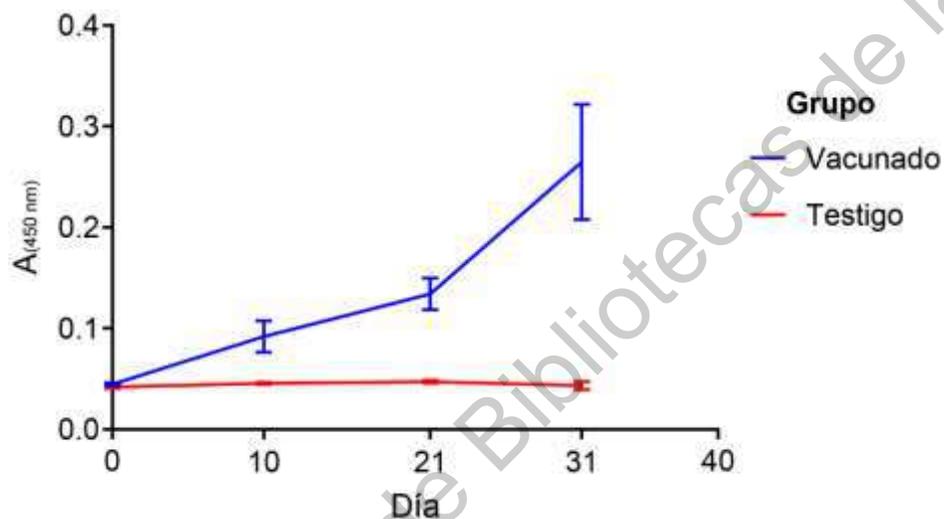
Grupo	ID ovino	PV <sub>d0</sub> (kg)	PV <sub>d31</sub> (kg)	GDP (g/día)
Control	BA1	31.5	45.5	411.76
	BA2	35.8	44.9	267.65
	BA3	26.4	45.0	547.06
	BA4	33.5	36.5	88.24
Tratado	BAz1	35.5	45.5	294.12
	BAz2	30.0	38.9	261.76
	BAz3	35.8	36.9	32.35
	BAz4	26.0	42.6	488.24

PV: peso vivo; GDP: ganancia diaria de peso.

### 11.2.2. Inmunogenicidad

La inmunogenicidad se determinó estimando la producción de anticuerpos específicos contra el antígeno vacunal mediante *ELISA* indirecta. Se encontró que la proteína vacunal es capaz de generar una respuesta inmune humoral detectable desde el décimo día, y que una segunda inmunización potencia el desarrollo de la misma.

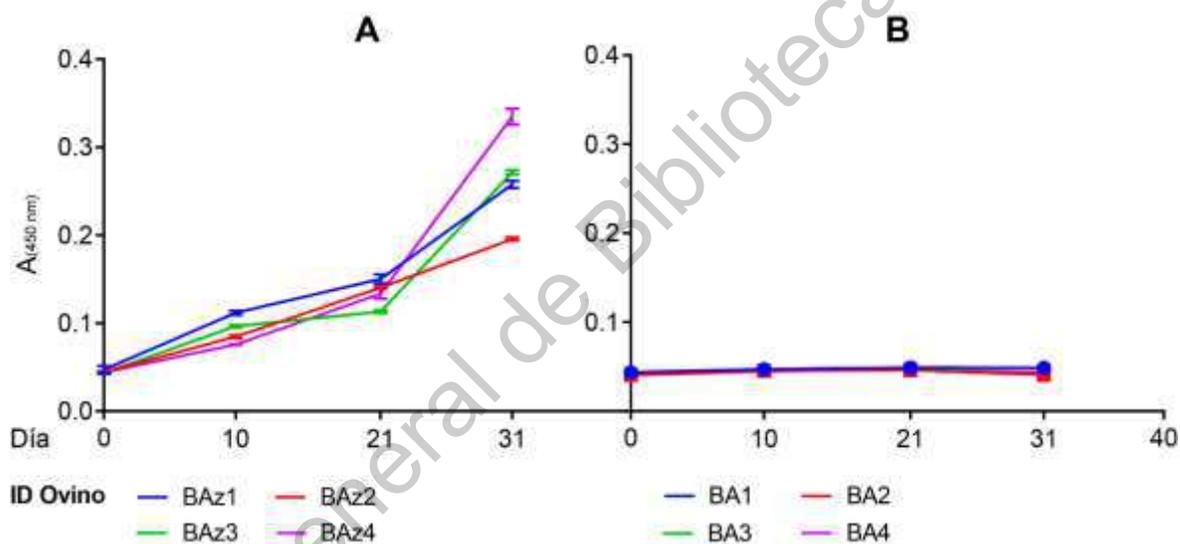
El grupo tratado desarrolló anticuerpos específicos contra el antígeno vacunal, observándose diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) desde el décimo día e incrementando en todas las mediciones subsecuentes hasta su punto máximo el día 31. El grupo tratado mostró un incremento paulatino y poca dispersión hasta la segunda inmunización el día 21, luego de la cual, experimentó un incremento acelerado con mayor dispersión, en contraste con el grupo control que nunca se seroconvirtió y se mantuvo con dispersión casi nula (Figura 3).



**Figura 3:** Determinación de anticuerpos promedio por grupo ovino.

Las barras indican la desviación estándar del promedio de cada individuo.  $A_{(450\text{ nm})}$ : densidad óptica.

La primera inmunización estimuló la generación de anticuerpos en todos los individuos del grupo tratado, la mayoría experimentó un incremento lento pero constante hasta antes de la segunda inmunización, salvo por el ejemplar BAz3, quien tuvo el peor desempeño hasta antes de la segunda inmunización, estancando su crecimiento en una meseta entre los días 10 y 21. La segunda inmunización potenció el desarrollo de anticuerpos en casi todos los individuos del grupo tratado, salvo del ejemplar BAz2, que experimentó un incremento casi lineal durante todo el experimento, y terminó con el peor desempeño de su grupo (Figura 4, panel A). Los individuos del grupo control nunca desarrollaron anticuerpos, por lo que mantuvieron una densidad óptica constante correspondiente con el ruido de fondo (Figura 4, panel B).



**Figura 4:** Determinación de anticuerpos por individuo, por grupo ovino.

Las barras indican la desviación estándar de tres repeticiones de cada individuo.  $A_{450 \text{ nm}}$ : densidad óptica. **A:** grupo tratado. **B:** grupo control. La desviación estándar en el panel B es tan pequeña que queda oculta por los puntos de las líneas.

En ensayos de vacunación en ovinos evaluados por otros autores se ha encontrado la presencia de anticuerpos específicos desde la primera semana postvacunación (séptimo día; Boumart *et al.*, 2019; Chandran *et al.*, 2010), sin embargo, en sus experimentos y en el presente trabajo no se recolectaron muestras diarias, por lo que resulta imposible determinar el momento exacto de la seroconversión. Los ensayos de vacunación en los cuales se aplica una segunda inmunización han

encontrado un pico en la respuesta humoral a la tercera semana postvacunación (día 28; Boumart *et al.*, 2019; Chandran *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010; Faburay *et al.*, 2016), similar a lo observado en el presente trabajo.

### 11.3. Evaluación de seguridad e inmunogenicidad en caprinos

#### 11.3.1. Seguridad

Ya que toda vacuna está diseñada para estimular el sistema inmune, es necesario mantener mente que la aplicación de vacunas está asociada a ciertos efectos secundarios como fiebre, enrojecimiento, hinchazón y/o dolor en el sitio de aplicación, generalmente el cuadro es leve y se presenta en las primeras 72 horas, desapareciendo algunos días después (Freund, 2021).

- **Estado general**

- **Actitud o postura:** todos los individuos presentaron actitud «normal» a lo largo de todo el experimento, caracterizada por la posición anatómica libremente adoptada de las extremidades, cabeza y cuello, con relación al tronco (Ramírez, 2008; Pacheco, 1991).
- **Comportamiento:** todos los individuos presentaron un comportamiento «normal», caracterizado por la forma típica de reaccionar a los estímulos del medio (ausencia de depresión, apatía, intranquilidad, furor, etcétera; Ramírez, 2008; Pacheco, 1991).
- **Condición corporal:** todos los individuos se mantuvieron con condición corporal de 2, «normal», a lo largo de todo el experimento, caracterizada por procesos espinales visibles no prominentes, costillas difícilmente visibles, huesos de la cadera visibles, pero no prominentes, se puede apreciar una capa de músculo o grasa sobre la nalga. Descensos en la condición corporal indican estados de afección crónicos (Stilwell *et al.*, 2015).
- **Aspecto clínico:** todos los individuos presentaron un aspecto clínico «normal» a lo largo de todo el experimento, caracterizada por una impresión externa saludable.

Los individuos se mantuvieron en buen estado general a lo largo de todo el experimento, las inmunizaciones no tuvieron efecto alguno sobre el aspecto clínico, estado de carnes, comportamiento, ni actitud.

- **Temperatura corporal:** se observó incremento leve y transitorio en algunos ejemplares luego de las inmunizaciones (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**)
  - Grupo testigo: ningún ejemplar incrementó su temperatura rectal luego de las inmunizaciones.
  - Tratamiento 1: un individuo presentó incremento leve de su temperatura durante los dos días subsecuentes a la primera inmunización (0.1 y 0.2 °C respectivamente, por sobre el límite superior), un individuo presentó incremento leve durante el segundo día (0.2 °C por sobre el límite superior), y un último sujeto se presentó en el límite superior el siguiente día luego de la inmunización y presentó un incremento leve durante el segundo día (0.1 °C por sobre el límite superior). Ningún ejemplar vio alterada su temperatura rectal luego de la segunda inmunización.
  - Tratamiento 2: un individuo presentó incremento de temperatura durante el segundo día postvacunación (0.5 °C por sobre el límite superior), y otro sujeto se presentó en el límite superior el mismo día. Un ejemplar se presentó en el límite superior el día siguiente a la segunda inmunización.
  - Tratamiento 3: dos ejemplares se presentaron en el límite superior durante el segundo día luego de la primera inmunización. Un ejemplar se mantuvo en el límite superior durante los dos días siguientes a la segunda inmunización.

**Cuadro 9:** Temperatura rectal postvacunación en caprinos.

Grupo	ID cabra	1ra inmunización				2da inmunización			
		D 0	D 1	D 2	D 3	D 21	D 22	D 23	D 24
Testigo	<b>CN0</b>	39.8	40.1	39.4	39.1	39.7	39.0	39.3	39.0
	<b>CN1</b>	39.6	39.7	39.2	39.7	39.1	39.3	39.1	39.1
	<b>CN2</b>	40.2	39.5	40.2	39.3	39.3	38.2	39.0	39.3
	<b>CN3</b>	39.7	39.8	40.1	39.2	39.3	38.8	39.4	39.3
	<b>CN4</b>	39.6	39.6	39.3	39.1	39.1	38.8	39.1	39.0

Tratamiento 1 (30 µg)	CG0	39.3	39.6	<b>40.5</b>	39.8	38.8	39.1	39.7	39.7
	CG1	39.1	<b>40.3</b>	<b>40.4</b>	39.8	39.7	39.3	39.1	39.4
	CG2	39.8	39.5	39.6	39.4	38.3	39.0	39.7	39.2
	CG3	39.8	39.4	39.0	39.7	38.5	39.1	39.3	39.1
	CG4	40.0	<b>40.4</b>	<b>40.5</b>	39.7	38.8	39.5	39.0	39.5
Tratamiento 2 (60 µg)	CA0	39.7	39.2	<b>40.3</b>	39.4	39.8	39.1	39.4	39.0
	CA1	39.7	39.5	39.4	39.6	39.3	38.7	39.2	39.2
	CA2	40.1	39.0	38.8	39.0	39.4	<b>40.3</b>	39.1	39.4
	CA3	39.7	39.4	39.7	40.1	39.7	39.8	39.7	39.4
	CA4	39.3	39.4	<b>40.8</b>	39.7	38.2	40.1	39.3	39.4
Tratamiento 3 (100 µg)	CAz0	39.4	39.4	<b>40.3</b>	39.1	38.4	<b>40.3</b>	<b>40.3</b>	39.1
	CAz1	39.5	39.6	39.4	39	39.0	39.6	39.9	39.4
	CAz2	39.4	39.0	38.4	39.4	39.4	40.1	39.8	39.9
	CAz3	39.8	39.4	39.1	39.2	38.2	38.8	39.7	39.6
	CAz4	39.4	39.5	<b>40.3</b>	39.5	39.9	39.7	39.3	39.1

Los valores se presentan en °C. Límite superior de 40.3 °C (González, 2018). D: día.

Se considera incremento «leve» cuando la temperatura rebasa hasta por 1 °C el límite superior (Ramírez, 2008). El incremento observado únicamente en los grupos tratados refleja una reacción al antígeno vacunal. Aunque Martínez *et al.* (1996) encontraron fiebre leve durante los tres días posteriores a la inmunización de cabras con adyuvante oleoso, Patil *et al.* (2002) no encontraron esta reacción empleando un adyuvante similar de la misma marca, presumiblemente por ser este una fórmula más moderna, no obstante, Martínez *et al.* (1996) encontraron una relación proporcional de la incidencia de fiebre con la dosis de antígeno administrado.

- **Reactividad de linfonodos regionales:** la tumefacción de los linfonodos ocurre principalmente como una respuesta defensiva a patógenos, al desatarse la proliferación de células inmunes dentro de ellos; se considera reactividad leve cuando el tamaño del linfonodo afectado supera su tamaño original en 1.5 veces, reactividad moderada al superarlo por hasta dos veces, y reactividad severa al superar por más del doble (Ramírez, 2008). Se observó reactividad leve y moderada de los LNR de ambos sitios de aplicación luego de las inmunizaciones (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**)
  - Grupo control: cuatro ejemplares presentaron reactividad leve del LNR diez días luego de la primera inmunización, mismo que se normalizó hacia el día

31. Ningún ejemplar presentó linfonodos reactivos luego de la segunda inmunización.

- Tratamiento 1: todo el grupo presentó reactividad moderada del LNR del primer sitio de aplicación al décimo día, la cual desapareció para el día 31. Un ejemplar presentó reactividad moderada, y otro, reactividad leve del LRN del segundo sitio de aplicación al día 31, la cual desapareció para el día 41.
- Tratamiento 2: tres individuos presentaron reactividad leve, y uno reactividad moderada del LNR del primer sitio de aplicación al décimo día, la cual se normalizó para el día 21. Dos individuos presentaron reactividad leve, y otro, moderada del LNR del segundo sitio de aplicación al día 31, misma que desapareció hacia el día 41.
- Tratamiento 3: tres sujetos presentaron reactividad leve, y otro, reactividad moderada del LNR del primer sitio de aplicación a los diez días luego de la primera inmunización, normalizándose para el día 21. Dos individuos presentaron reactividad leve, y otro, reactividad moderada del LNR del segundo sitio de aplicación para el día 31, misma que se normalizó para el día 41.

**Cuadro 10:** Reactividad de linfonodos regionales en caprinos.

Grupo	ID cabra	Tamaño LNR 1r sitio (mm)			Tamaño LNR 2do sitio (mm)		
		D 0	D 10	D 31	D 21	D 31	D 41
Testigo	CN0	15	21*	15	19	19	17
	CN1	19	27*	18	16	19	17
	CN2	13	19*	16	15	18	16
	CN3	12	18*	14	14	15	14
	CN4	17	19	18	18	19	15
Tratamiento 1 (30 µg)	CG0	15	21*	17	16	35**	16
	CG1	14	20*	17	12	25*	13
	CG2	14	19*	17	15	19	16
	CG3	18	25*	19	15	17	18
	CG4	10	15*	12	15	18	13
Tratamiento 2 (60 µg)	CA0	15	18*	16	16	20	17
	CA1	17	18	17	15	17	14
	CA2	16	30**	19	15	22*	14
	CA3	19	28*	16	13	25**	14
	CA4	15	22*	13	14	19*	13
Tratamiento 3 (100 µg)	CAz0	15	22*	17	15	15	18
	CAz1	16	23*	19	14	21*	15
	CAz2	20	35**	22	14	22*	16
	CAz3	17	17	17	15	19	16
	CAz4	14	21*	16	11	20**	13

D: día. LNR: linfonodo regional; (\*): reactividad leve; (\*\*) reactividad moderada.

- **Reacción en el sitio de aplicación:** se encontraron reacciones postvacunales leves y moderadas en el sitio de aplicación, de aproximadamente cinco días de duración; luego de la primera inmunización se encontraron cuadros de inflamación y edema inicial con inflamación residual, luego de la segunda inmunización, el cuadro principal fue edema, seguido de inflamación, y por último, edema inicial con inflamación residual (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**)
  - Grupo testigo: dos individuos presentaron reacción postvacunal inflamatoria de tres días de duración, y otro de dos días luego de la primera inmunización. Todos los individuos presentaron reacción luego de la segunda inmunización, tres de ellos de cinco días de duración, uno de tres y otro de dos; la reacción se presentó como un edema de rápida resolución rodeando una zona inflamada.
  - Tratamiento 1: tres individuos presentaron reacción postvacunal de cinco días de duración, y otro sujeto, de tres días luego de la primera inmunización; la reacción se caracterizó por un edema inicial con inflamación residual. Todos los individuos presentaron reacción postvacunal luego de la segunda inmunización de cuatro días de duración, salvo un individuo que la presentó solo por tres días; dos individuos presentaron únicamente edema, y otros dos, únicamente inflamación.
  - Tratamiento 2: cuatro individuos presentaron reacción postvacunal luego de la primera inmunización, dos de tres días de inflamación, uno de cuatro días de duración con edema inicial e inflamación residual, y uno de tres días de duración. Todos los individuos presentaron edema postvacunal luego de la segunda inmunización, tres de cuatro días duración, uno de tres días y otro de solo dos días.
  - Tratamiento 3: todos los individuos presentaron reacción postvacunal, cuatro sujetos de cuatro días de duración y uno de tres días; la reacción se caracterizó por un edema inicial e inflamación residual, salvo por dos individuos que presentaron solo inflamación. Todos los individuos

presentaron reacción postvacunal luego de la segunda inmunización, cuatro individuos con cuadros de cuatro días de duración, y uno de tres días; hubo dos casos de inflamación pura, dos de edema puro, y uno de edema inicial e inflamación residual.

**Cuadro 11:** reacciones locales postvacunación en caprinos.

Grupo	ID cabra	1ra inmunización				2da inmunización			
		D 1	D 2	D 3	D 4	D 22	D 23	D 24	D 25
Control	CN0	Ede. 30 x 37	Infl. 20 x 19	Infl 17 x 25	—	Ede. 64 x 49	Ede. 39 x 22	Ede. 10 x 12	—
	CN1	—	Infl. 17 x 28	Infl 5 x 12	—	Infl. 39 x 41	Infl. 26 x 31	Infl. 14 x 25	Infl. 8 x 19
	CN2	—	—	—	—	Ede. 114 x 79	Infl. 64 x 55	Infl. 27 x 25	Infl. 18 x 18
	CN3	—	—	—	—	Ede. 51 x 77	Ede. 33 x 69	Ede. 16 x 34	Ede. 18 x 39
	CN4	Infl. 23 x 45	Infl. 12 x 28	Infl. 5 x 14	—	Infl. 39 x 40	Infl. 15 x 25	—	—
Tratamiento 1 (30 µg)	CG0	—	—	—	—	Ede. 40 x 62	Ede. 23 x 35	Ede. 17 x 20	Ede. 10 x 10
	CG1	—	—	—	—	Ede. 35 x 74	Ede. 18 x 36	Ede. 6 x 21	—
	CG2	Ede. 34 x 45	Ede. 29 x 33	Ede. 15 x 20	Infl. 4 x 12	Infl. 42 x 71	Infl. 32 x 40	Infl. 18 x 33	Infl. 7 x 21
	CG3	Ede. 44 x 103	Ede. 29 x 55	Infl. 15 x 24	Infl. 5 x 14	Infl. 47 x 69	Infl. 28 x 47	Infl. 17 x 32	Infl. 9 x 21
	CG4	—	Infl. 18 x 28	Infl. 15 x 24	Infl. 6 x 12	Ede. 60 x 69	Infl. 47 x 44	Infl. 36 x 35	Infl. 22 x 20
Tratamiento 2 (60 µg)	CA0	Infl. 26 x 38	Infl. 13 x 18	Infl. 4 x 10	—	Ede. 61 x 72	Ede. 24 x 32	Ede. 15 x 21	—
	CA1	Ede. 55 x 55	Ede. 32 x 42	Infl. 23 x 34	Infl. 14 x 26	—	Ede. 34 x 42	Ede. 13 x 14	—
	CA2	—	Infl. 24 x 40	Infl. 13 x 22	Infl. 5 x 12	Ede. 77 x 100	Ede. 44 x 75	Ede. 31 x 62	Ede. 20 x 32
	CA3	—	—	—	—	Ede. 42 x 75	Ede. 27 x 56	Ede. 12 x 32	Ede. 6 x 21
	CA4	Ede. 21 x 42	Infl. 17 x 17	Infl. 6 x 8	—	Ede. 55 x 78	Ede. 26 x 55	Infl. 19 x 28	Infl. 8 x 15
Tratamiento 3 (100 µg)	CAz0	Ede. 47 x 32	Ede. 30 x 17	Infl. 26 x 6	Infl. 12 x 3	Infl. 64 x 101	Infl. 54 x 76	Infl. 39 x 42	Infl. 15 x 20
	CAz1	Infl. 30 x 45	Infl. 23 x 30	Infl. 17 x 24	Infl. 5 x 14	Ede. 45 x 71	Ede. 31 x 58	Infl. 21 x 30	Infl. 9 x 16
	CAz2	Ede. 40 x 75	Ede. 21 x 37	Infl. 14 x 26	Infl. 6 x 12	Ede. 53 x 70	Ede. 39 x 58	Ede. 24 x 18	Ede. 13 x 7

<b>CAz3</b>	Infl. 35 x 45	Infl. 18 x 32	Infl. 6 x 21	—	Infl. 52 x 64	Infl. 39 x 42	Infl. 26 x 28	Infl. 17 x 21
<b>CAz4</b>	Ede. 40 x 48	Infl. 31 x 28	Infl. 20 x 14	Infl. 6 x 3	Ede. 62 x 91	Ede. 38 x 73	Ede. 20 x 42	—

D: día. Infl.: inflamación. Ede.: edema. (—): sin reacción.

La ocurrencia de estas reacciones postvacuales en prácticamente la totalidad de los individuos puede denotar un papel del adyuvante en la causa de la misma. De igual forma, algunos autores se han encontrado con la presentación de reacciones postvacunales en el sitio de aplicación empleando adyuvantes oleosos en cabras (Martínez *et al.*, 1996). El estudio de vacunación de Zhugunissov *et al.* (2018) llevado a cabo en ovinos, pero empleando el mismo adyuvante que en el presente trabajo, se encontró una reacción inflamatoria leve postvacunal de 5 días de duración en todos los individuos, y se sugirió que la causa fue el depósito subcutáneo del adyuvante en el sitio de aplicación.

- **Enzimas hepáticas:** en ninguna medición, ningún individuo presentó incremento en la actividad sérica de ALT o AST, sugiriendo la falta de efectos hepáticos del antígeno vacunal en caprinos.
- **Hemograma completo:** dos hallazgos comunes en todos los grupos fueron la linfocitosis leve y la presencia de bandas. La linfocitosis se asocia con estimulación antigénica crónica, especialmente en individuos jóvenes que se exponen a multitud antígenos ambientales por primera vez, y en animales vacunados (Jackson, 2005). La presencia de neutrófilos inmaduros (bandas) sin otro cambio patológico puede explicarse por la edad de los animales, ya que estas células suelen ser más comunes en animales jóvenes (Jackson, 2007). A continuación, se presenta el resultado del hemograma completo (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), así como su interpretación correspondiente (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).
  - Grupo control: tres individuos únicamente presentaron neutrófilos en banda, otro presentó linfocitosis leve con presencia de bandas, y uno más presentó leucocitosis por neutrofilia con desviación a la izquierda. Esta última condición se asocia con cuadros de infección severa (Jackson, 2005), no obstante, en las evaluaciones de rutina realizadas ese día, así como los anteriores y posteriores, no se encontró un estado obvio de enfermedad, es

posible que el resultado se trate de un error en el procesamiento de la muestra.

- Tratamiento 1: todos los individuos presentaron neutrófilos en banda, además, uno presentó trombocitosis leve, y dos presentaron linfocitosis leve. La trombocitosis se asocia con desórdenes tromboembólicos, debido a la producción anormal desde la médula ósea (Jackson, 2005), más estudios son requeridos para determinar si se trata de un hallazgo con significancia clínica, si se trata de un error en el procesamiento de la muestra, o se debe a los parámetros de evaluación empleados.
- Tratamiento 2: todos los individuos presentaron neutrófilos en banda, y un sujeto presentó además trombocitopenia leve. La trombocitopenia se asocia con hemorragias superficiales en piel y mucosas (Jackson, 2005), sin embargo, estas no fueron encontradas en el sujeto en cuestión, sin la posibilidad de examinar el frotis, queda la interrogante de si se trata de un artefacto de aglutinación.
- Tratamiento 3: Un individuo presentó monocitosis leve, dos presentaron leucocitosis leve con presencia de bandas, uno solo presentó neutrófilos en banda, y otro presentó un hemograma normal. La monocitosis se asocia a condiciones inflamatorias no purulentas como la formación de granulomas, destrucción de tejidos y reacción a antígenos (Jackson, 2005).

**Cuadro 12:** Hemograma completo de caprinos.

Parámetro	Unidades	Rango	Grupo testigo					Tratamiento 1 (30 µg)				
			CN0	CN1	CN2	CN3	CN4	CG0	CG1	CG2	CG3	CG4
VCA	%	22 – 38	<b>44</b>	<b>38.5</b>	<b>39.1</b>	<b>41.4</b>	<b>40.5</b>	35.3	<b>43</b>	<b>43.6</b>	35.9	<b>41.2</b>
Hgb	g/dl	8 – 12	<b>13.1</b>	11.8	11.7	12	<b>13.4</b>	10.6	<b>13.4</b>	<b>13.4</b>	11.2	<b>12.6</b>
CMHC	g/dl	30 – 36	<b>29.8</b>	30.6	<b>29.9</b>	<b>29</b>	33.1	30	31.2	30.7	31.2	30.6
Plaquetas	× 10 <sup>9</sup> /l	800 – 1200	945	1119	927	996	930	882	<b>1212</b>	1045	842	1143
LT	× 10 <sup>9</sup> /l	4 – 13	<b>15.1</b>	8.1	<b>13.7</b>	18	<b>14.9</b>	9.9	7.5	6	<b>15</b>	<b>16.1</b>
Neutrófilos	%	30 – 48	38	<b>33</b>	30	<b>25</b>	<b>59</b>	<b>44</b>	<b>21</b>	<b>41</b>	<b>28</b>	<b>26</b>
	× 10 <sup>9</sup> /l	1 – 7.2	5.7	2.7	4.1	4.5	<b>8.8</b>	4.4	1.6	2.5	4.2	4.2
Bandas	%	0 – 0	<b>1</b>	0	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>
	× 10 <sup>9</sup> /l	–	<b>0.2</b>	0	<b>0.1</b>	<b>0.2</b>	<b>0.6</b>	<b>0.1</b>	<b>0.2</b>	<b>0.1</b>	<b>0.3</b>	<b>0.2</b>
Linfocitos	%	50 – 70	59	64	64	<b>73</b>	<b>37</b>	51	<b>71</b>	53	67	<b>73</b>
	× 10 <sup>9</sup> /l	2 – 9	8.9	5.2	8.8	<b>13.1</b>	5.5	5	5.3	3.2	<b>10.1</b>	<b>11.8</b>
Monocitos	%	0 – 4	2	0	0	1	0	4	3	1	2	0
	× 10 <sup>9</sup> /l	0 – 0.55	0.3	0	0	0.2	0	0.4	0.2	0.1	0.3	0

<b>Eosinófilos</b>	%	0 – 8	0	3	1	0	0	0	2	3	1	0
	$\times 10^9 / l$	0 – 0.65	0	0.2	0.1	0	0	0	0.2	0.2	0.2	0
<b>Basófilos</b>	%	0 – 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	$\times 10^9 / l$	0 – 0.12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Parámetro	Unidades	Rango	Tratamiento 2 (60 µg)					Tratamiento 3 (100 µg)				
			CA0	CA1	CA2	CA3	CA4	CAz0	CAz1	CAz2	CAz3	CAz4
<b>Ht</b>	%	22 – 38	<b>39.7</b>	35.2	34.1	37.2	<b>40.3</b>	37.5	<b>40.3</b>	<b>39</b>	<b>40.1</b>	<b>42.9</b>
<b>Hgb</b>	g/dl	8 – 12	<b>12.4</b>	11.9	11.2	11.5	<b>12.5</b>	11.1	<b>12.3</b>	11.8	<b>12.5</b>	<b>13.1</b>
<b>CMHC</b>	g/dl	30 – 36	31.2	33.8	32.8	30.9	31	<b>29.6</b>	30.5	30.3	31.2	30.5
<b>Plaquetas</b>	$\times 10^9 / l$	800 – 1200	1006	832	<b>745</b>	1083	1120	1133	1217	1196	993	1036
<b>LT</b>	$\times 10^9 / l$	4 – 13	9.2	9.9	5.8	9.7	11.2	10.4	<b>13.3</b>	<b>13.7</b>	6.9	8.7
<b>Neutrófilos</b>	%	30 – 48	41	38	48	<b>51</b>	<b>54</b>	46	<b>27</b>	47	<b>18</b>	37
	$\times 10^9 / l$	1 – 7.2	3.8	3.8	2.8	4.9	6	4.8	3.6	6.4	1.2	3.2
<b>Bandas</b>	%	0 – 0	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	0	<b>3</b>	<b>5</b>	0	<b>3</b>
	$\times 10^9 / l$	–	<b>0.1</b>	<b>0.1</b>	<b>0.1</b>	<b>0.2</b>	<b>0.1</b>	0	<b>0.4</b>	<b>0.7</b>	0	<b>0.3</b>
<b>Linfocitos</b>	%	50 – 70	55	58	<b>47</b>	<b>40</b>	51	<b>47</b>	66	<b>47</b>	<b>78</b>	58
	$\times 10^9 / l$	2 – 9	5.1	5.7	2.7	3.9	5.7	4.9	8.8	6.4	5.4	5
<b>Monocitos</b>	%	0 – 4	3	2	4	3	2	<b>6</b>	1	1	3	0
	$\times 10^9 / l$	0 – 0.55	0.3	0.2	0.2	0.3	0.2	<b>0.6</b>	0.1	0.1	0.2	0
<b>Eosinófilos</b>	%	1 – 8	0	1	0	2	2	1	3	0	1	2
	$\times 10^9 / l$	0.05 – 0.65	0	0.1	0	0.2	0.2	0.1	0.4	0	0.1	0.2
<b>Basófilos</b>	%	0 – 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	$\times 10^9 / l$	0 – 0.12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Valores de referencia obtenidos de Aiello & Moses (2016). VCA: volumen celular aglomerado; Hgb: hemoglobina; CMHC: concentración media de hemoglobina corpuscular; LT: leucocitos totales.

**Cuadro 13:** Interpretación de hemogramas caprinos.

Grupo	ID cabra	Interpretación del hemograma
<b>Testigo</b>	<b>CN0</b>	Presencia de bandas
	<b>CN1</b>	Presencia de bandas
	<b>CN2</b>	Presencia de bandas
	<b>CN3</b>	Presencia de bandas, linfocitosis leve
	<b>CN4</b>	Leucocitosis por neutrofilia con desviación a la izquierda
<b>Tratamiento 1 (30 µg)</b>	<b>CG0</b>	Presencia de bandas
	<b>CG1</b>	Trombocitosis, presencia de bandas
	<b>CG2</b>	Presencia de bandas
	<b>CG3</b>	Leucocitosis por linfocitosis leve, presencia de bandas.
	<b>CG4</b>	Leucocitosis por linfocitosis leve, presencia de bandas
<b>Tratamiento 2 (60 µg)</b>	<b>CA0</b>	Presencia de bandas
	<b>CA1</b>	Presencia de bandas
	<b>CA2</b>	Trombocitopenia leve, presencia de bandas
	<b>CA3</b>	Presencia de bandas
	<b>CA4</b>	Presencia de bandas
<b>Tratamiento 3 (100 µg)</b>	<b>CAz0</b>	Monocitosis leve
	<b>CAz1</b>	Leucocitosis leve, presencia de bandas
	<b>CAz2</b>	Leucocitosis leve, presencia de bandas
	<b>CAz3</b>	Sin cambios patológicos aparentes
	<b>CAz4</b>	Presencia de bandas

- **Ganancia diaria de peso:** sirve como un indicador del desarrollo en animales jóvenes (González, 2018), y se ha empleado para medir la reducción en la tasa de crecimiento causada por estados de afección en caprinos (Iqbal *et al.*, 2013). Al término del experimento, la ganancia diaria de peso de ningún grupo presentó diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), por lo que se infiere que las inmunizaciones no tuvieron efecto sobre la tasa de crecimiento.

**Cuadro 14:** Ganancia diaria de peso en caprinos.

Grupo	ID cabra	Peso vivo (kg)			GDP (g/día)		
		D 0	D 31	D 50	D 0 a 31	D 0 a 50	D 31 a 50
Testigo	CN0	20.1	21.0	22.5	26.47	48.36	94.88
	CN1	22.0	23.8	24.6	52.94	51.50	48.44
	CN2	19.1	21.7	22.9	76.47	76.64	77.00
	CN3	28.8	29.5	29.8	20.59	20.16	19.25
	CN4	24.2	25.9	26.1	50.00	38.58	14.31
Tratamiento 1 (30 µg)	CG0	22.6	23.8	25.6	35.29	59.04	109.50
	CG1	20.8	21.4	22.3	17.65	30.86	58.94
	CG2	25.0	26.0	26.1	29.41	21.22	3.81
	CG3	26.7	28.0	28.4	38.24	33.56	23.63
	CG4	19.1	20.0	21.9	26.47	56.20	119.38
Tratamiento 2 (60 µg)	CA0	26.2	27.7	27.8	44.12	32.22	6.94
	CA1	22.4	23.8	25.2	41.18	55.90	87.19
	CA2	22.4	23.9	24.4	44.12	40.94	34.19
	CA3	17.8	18.4	20.1	17.65	45.64	105.13
	CA4	24.4	25.6	26.9	35.29	49.18	78.69
Tratamiento 3 (100 µg)	CAz0	24.9	25.9	26.4	29.41	29.04	28.25
	CAz1	25.5	26.8	27.4	38.24	37.92	37.25
	CAz2	16.5	19.0	19.8	73.53	65.52	48.50
	CAz3	22.9	24.3	24.4	41.18	29.76	5.50
	CAz4	22.6	23.8	24.7	35.29	42.46	57.69

D: día. PV: peso vivo; GDP: ganancia diaria de peso.

### 11.3.2. Inmunogenicidad

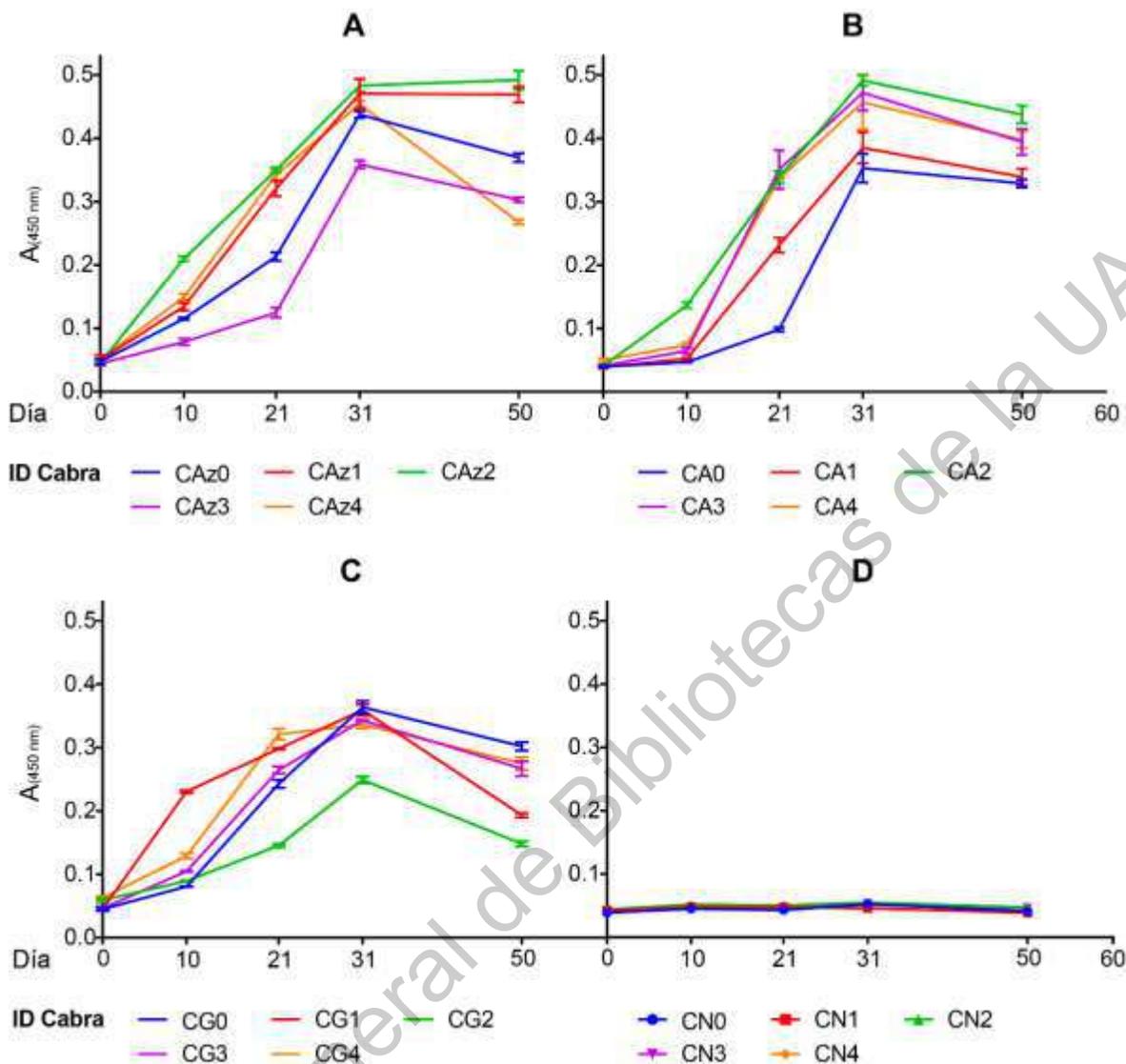
La inmunogenicidad se determinó estimado la producción de anticuerpos específicos contra el antígeno vacunal mediante *ELISA* indirecta. Se encontró que la proteína vacunal es capaz de generar una respuesta inmune humoral específica detectable desde el décimo día y que persiste hasta 50 días después.

- **Tratamiento 3:** la dosis de 100 µg (Figura 5, panel A) estimuló la producción de anticuerpos de forma casi lineal hasta el día 31 en tres individuos, los otros dos

presentaron un incremento lento hasta antes de la segunda inmunización, misma que potenció el desarrollo de anticuerpos hasta el día 31. Del día 31 al día 50, la respuesta humoral se debilitó en la mayoría de los individuos, solo dos mantuvieron un alza mientras que el resto decrecieron, especialmente el individuo CAz4 quien, pese a haber comenzado con una respuesta casi lineal hasta el día 31, vio su respuesta humoral debilitada para el día 50 a tal grado de quedar con el peor desempeño de su grupo.

- **Tratamiento 2:** la primera dosis de 60 µg estimuló la producción de anticuerpos alcanzando niveles a penas detectables desde el décimo día en todos salvo el sujeto CA2. La respuesta humoral entre los días 10 y 21 creció de forma casi lineal en todos los individuos salvo CA0, en quien es posible ver el efecto de la segunda inmunización. Del día 31 al día 50, todos los individuos vieron mermada su respuesta humoral (Figura 5, panel B).
- **Tratamiento 1:** la dosis de 30 µg (Figura 5, panel C) provocó una respuesta humoral detectable desde el día 10, apreciándose un incremento casi lineal en todos los individuos hasta el día 31, seguido un decremento gradual hasta el día 50.
- **Grupo testigo:** estos individuos nunca desarrollaron una respuesta humoral, por lo que mantuvieron una densidad óptica constante durante todo el experimento, correspondiente con el ruido de fondo (Figura 5, panel D).

Bastante similar a lo encontrado en el presente estudio, los ensayos de vacunación en caprinos de otros autores se ha hallado la presencia de anticuerpos específicos desde la primera semana postvacunación (Boumart *et al.*, 2019; Mendes *et al.*, 2010; Sinnathamby *et al.*, 2001), sin embargo, en sus experimentos y en el presente trabajo no se recolectaron muestras diarias, por lo que resulta imposible determinar el momento exacto de la seroconversión. Los ensayos en los cuales se aplica una segunda inmunización para potenciar la respuesta inmune generada han encontrado un pico en la respuesta humoral alrededor de diez días después de la segunda dosis, seguido de un descenso paulatino de hasta seis meses (Bu *et al.*, 2020; Boumart *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2010; Sinnathamby *et al.*, 2001).



**Figura 5:** Determinación de anticuerpos por individuo, por grupo caprino.

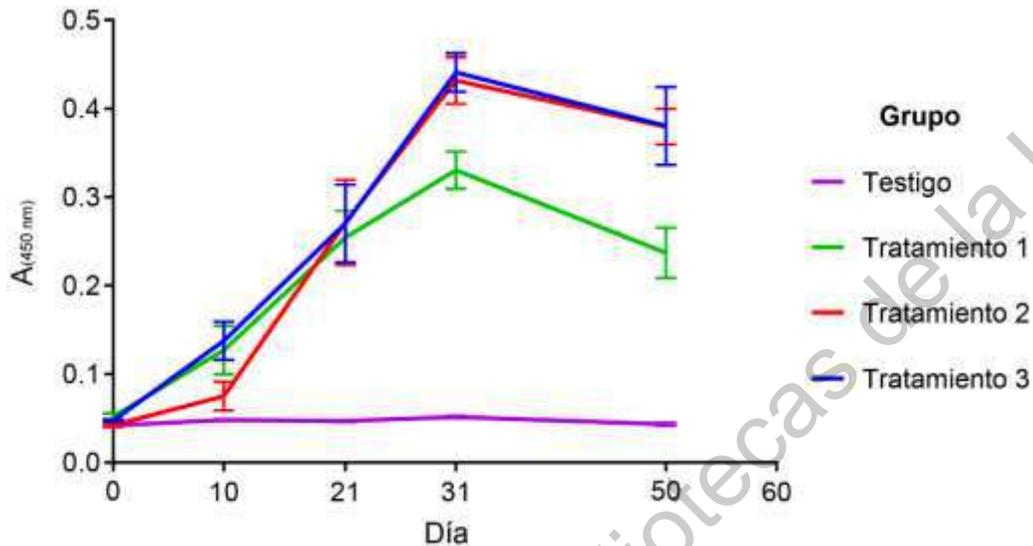
Las barras indican la desviación estándar de tres repeticiones de cada individuo.  $A_{(450\text{ nm})}$ : densidad óptica. **A:** tratamiento 3 (100 µg). **B:** tratamiento 2 (60 µg). **C:** tratamiento 1 (30 µg). **D:** grupo testigo. La desviación estándar en el panel D es tan pequeña que queda oculta por los puntos de las líneas.

#### 11.4. Determinación de dosis vacunal

La dosis vacunal se determinó a partir del análisis estadístico del comportamiento de la respuesta humoral vista en los grupos tratados.

La determinación de anticuerpos del grupo control se mantuvo sin cambios a lo largo de todas las mediciones, mientras que los grupos con tratamiento sostuvieron un alza hasta el día 31, y experimentaron una ligera caída el día 50. Los tratamientos

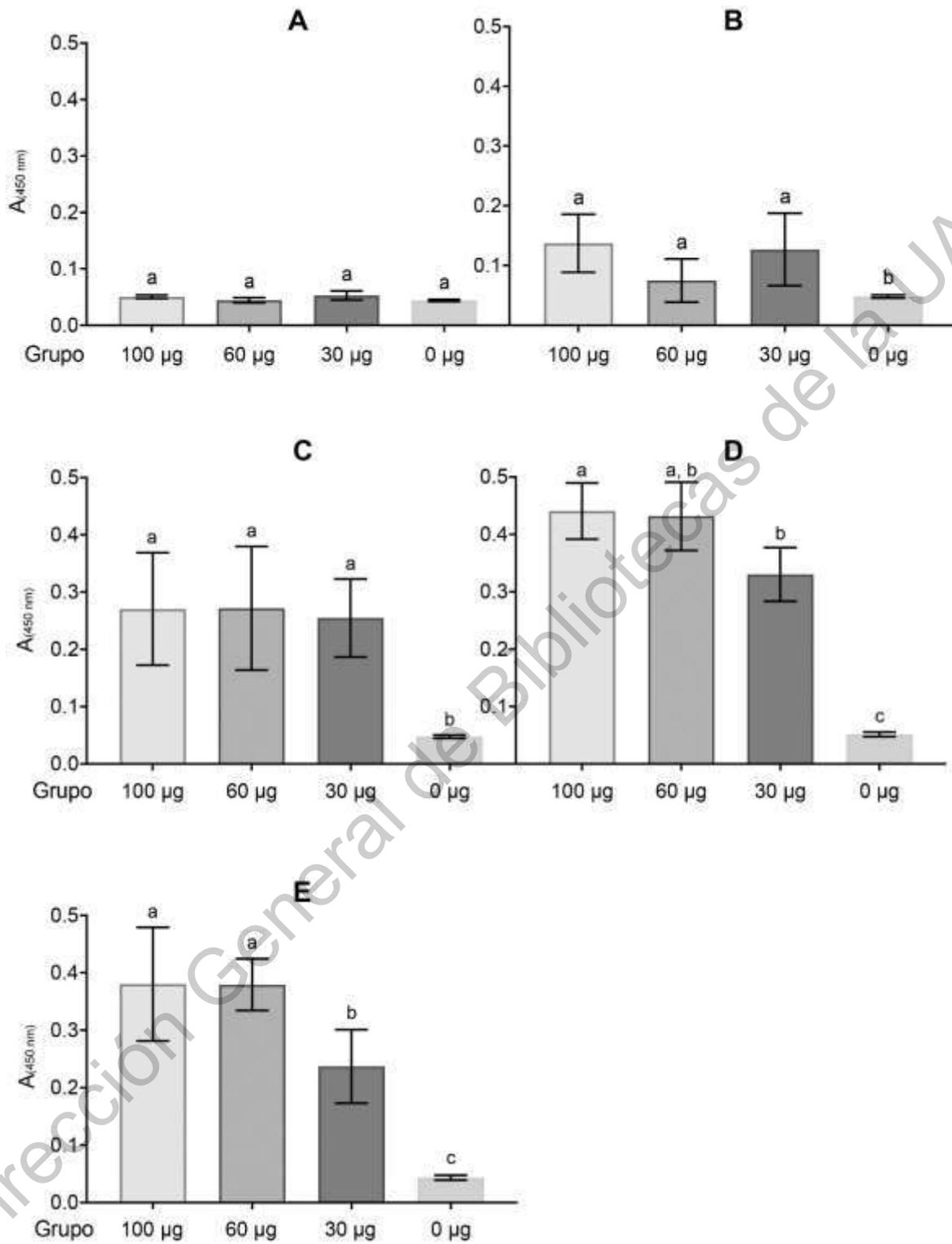
1 y 3 (30 y 100  $\mu\text{g}$  respectivamente) experimentaron un crecimiento casi lineal hasta el día 31; el tratamiento 2 (60  $\mu\text{g}$ ) tuvo un comienzo flojo hasta el día 10, pero rápidamente se puso y mantuvo a la par del tratamiento 3 (100  $\mu\text{g}$ ; Figura 6).



**Figura 6:** Determinación de anticuerpos promedio por grupo caprino.

Las barras indican la desviación estándar del promedio de cada individuo.  $A_{(450 \text{ nm})}$ : densidad óptica. La desviación estándar en el grupo control es tan pequeña que queda oculta por las líneas.

Se observó diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) entre los grupos tratados y el grupo control desde el día 10 (Figura 7 panel B) y en el resto de mediciones subsecuentes. No aparecieron diferencias estadísticas significativas entre los grupos tratados hasta el día 31 (Figura 7 panel D), en el que el tratamiento 1 (30  $\mu\text{g}$ ) se diferenció del tratamiento 3 (100  $\mu\text{g}$ ). Los tratamientos 2 y 3 (60 y 100  $\mu\text{g}$  respectivamente) presentaron la respuesta humoral más elevada, y nunca hubo diferencia estadística significativa entre ellos ( $P > 0.05$ ; Figura 7, panel E)



**Figura 7:** Comparación estadística de los grupos caprinos.

Promedio de los grupos con desviación estándar.  $A_{(450\text{ nm})}$ : densidad óptica. **A:** día 0. **B:** día 10. **C:** día 21. **D:** día 31. **E:** día 50.

La respuesta inmune generada por los tratamientos 3 y 2 fueron las mejores, y al no existir diferencia estadística significativa entre ellas, se sugiere para futuros ensayos el empleo de 60  $\mu\text{g}$  de este antígeno vacunal como la dosis óptima.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

## **12. Conclusión**

En el presente trabajo, se obtuvo el antígeno vacunal en cantidad y calidad suficientes para realizar los ensayos de vacunación y las pruebas inmunológicas. Se determinó que el antígeno vacunal es inmunogénico en ovinos y caprinos. Se determinó que la vacuna es segura. Se determinó que la dosis vacunal óptima es la de dos dosis de 60 µg con tres semanas de diferencia.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

### **13. Consideraciones**

Aunque se ha demostrado que el antígeno vacunal es inmunogénico, aún se debe determinar los niveles de anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes, afinidad de anticuerpos, de perfil de la respuesta células T ( $T_{H1}/T_{H2}$ ), caracterizar la funcionalidad de la respuesta inmune (ensayos de neutralización *in vitro*), caracterizar la estimulación de células T  $CD8^+$  y  $CD4^+$ ; con la finalidad de someter el proyecto a las autoridades sanitarias regulatorias del país y redactar el Documento Técnico Común y poder continuar con los estudios clínicos.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

## 14. Referencias

Abdel-Moniem A. S., & Abdelwhab E. M. 2020. Evidence for SARS-CoV-2 Infection of animal hosts. *Pathogens*: from MDPI. 9(7): 529. DOI: 10.3390/pathogens9070529

Aiello S. E., & Moses M. A. Reference guides. 2016. En: Aiello S. E., & Moses M. A. *The Merck veterinary manual*. 11va edición, Merck & Co., Inc. EE. UU. Pp.: 3173 - 3185.

Arous J. B., Deville S., Pal J. K., Baksi S., Bertrand F., & Dupuis L. 2013. Reduction of Newcastle disease vaccine dose using a novel adjuvant for cellular immune response in poultry. *Procedia Vaccinol.* 7: 28 - 33. DOI: 10.1016/j.provac.2013.06.006

Australian Technical Advisory Group on Immunisation (ATAGI). 2018. *Australian immunisation handbook*. Australian Government Department of Health. Canberra.

Bezoz J., de Juan L., Romero B., Álvarez J., Mazzucchelli F, Mateos A., Domínguez L., & Aranaz A. 2009. Experimental infection with *Mycobacterium caprae* in goats and evaluation of immunological status in tuberculosis and paratuberculosis co-infected animals. *Vet Immunol Immunopathol.* 133(4): 269 - 257. DOI: doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.07.018

Bornhorst J. A., & Falke J. F. 2000. Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods Enzymol.* 236: 245 - 254. DOI: 10.1016/s0076-6879(00)26058-8

Boumart Z., Daouam S., Bamouh Z., Jazouli M., Tadlaoui K. O., Dungu B., Bettinger G., Watts D. M., & Elharrak M. 2019. Safety and immunogenicity of a live attenuated Rift Valley Fever recombinant arMP-12ΔNS21/384 vaccine for sheep, goats and calves. *Vaccine.* 37: 1642 - 1650. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.01.067

Bu Y., Jia C., Tian X., Aimulajiang K., Menon M. A., Yan R., Song X., Xu L, & Li X. 2020. Immunizations of goats with recombinant protein 14-3-3 isoform 2(rHcftt-2)

induced moderate protection against *Haemonchus contortus* challenge. Pathogens: from MDPI. 9(1): 46. DOI: 10.3390/pathogens9010046

Carter-Timofte, M. E., Jørgesen S. E., Freytag M. R., Thomsen M. M., Andersen N-S B., Mousawi A. A., Hait A. S., & Mogensen T. H. 2020 Deciphering the role of host genetics in susceptibility to severe COVID-19. Front Immunol. 11: 1606 DOI: 10.3389/fimmu.2020.01606

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Lo que usted debe saber acerca del COVID-19 para protegerse a usted y a los demás. 2020. CS 314937B.

Chandran D., Naidu S. S., Sugumar P., Rani G. S., Vijayan S. P., Marhur D., Garg L., & Srinivasan V. A. 2010. Development of a recombinant epsilon-toxoid vaccine against enterotoxemia and its use as a combination vaccine with live attenuated sheep poxvirus against enterotoxemia and sheep pox. Clin Vaccine Immunol. 17(6): 1013 - 1016. DOI: 10.1028/CVI.00013-10

Chen T., Yang Q., & Duan H. 2020. A severe coronavirus disease 2019 patient with high-risk predisposing factors died from massive gastrointestinal bleeding: a case report. BMC Gastroenterol. 20: 318. DOI: doi.org/10.1186/s12876-020-01458-x

Chen W., Hu S., Qu L., Hu Q., Zhang Q., Zhi H., Huang K., & Bu Z. 2010. A goat poxvirus-vectored peste-des-petits-ruminants vaccine induces long lasting neutralization antibody to high level in goats and sheep. Vaccine. 28(30): 4742 - 4750. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.04.102

Dai W., Zhang H., Yu J., Xu H., Chen H., Luo S., Zhang H., Liang L., Wu X., Lei Y., & Lin F. 2020. CT imaging and differential diagnosis of COVID-19. Can Assoc Radiol J. 71(2): 195 - 200. DOI: 10.1177/0846537120913033

Davis M. M., Butchart A. T., Wheeler J. R., Coleman M. S., Singer D. C., & Freed G. L. 2011. Failure-to-success ratios, transition probabilities and phase lengths for prophylactic vaccines versus other pharmaceuticals in the development pipeline. Vaccine. 29(51): 9414 - 9416. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.09.128

Desclozeaux M., Jelocnik M., Whitting K., Saifzadeh S., Bommana S., Potter A., Gredts V., Timms P., & Polkinghorne A. 2017. Safety and immunogenicity of a prototype anti-*Chlamydia pecorum* recombinant protein vaccine in lambs and pregnant ewes. *Vaccine*. 35(27): 3461 – 3465 DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.03.091

Dirección General de Epidemiología. Datos abiertos COVID-19. Disponible en: <https://datos.covid-19.conacyt.mx/>

Dominoswki P., Klose P., Krebs R., & Mannan R. 2004. Microfluidized oil-in-water emulsions and vaccine compositions. United States Patent Application Publication. Pub. No.: US 20040258701A1

Dwyer C., Richmond S., Wemelsfelder F., Ruiz R., de Heredia I. B. & Arranz J. 2015. AWIN welfare assessment protocol for sheep. En: AWIN, AWIN welfare assessment protocol for sheep. AWIN project. Unión Europea. Pp.: 21-22. DOI: 10.13130/AWIN\_SHEEP\_2015

European medicines agency (EMA). 1997. Note for guidance on preclinical pharmacological and toxicological testing of vaccines. Human medicines evaluation unit.

Faburay B., Wilson C. W., Gaudreault N. N., Davis A. S., Shivanna V., Bawa B., Sunwoo S. Y., Ma W., Drolet B. S., Morozov I., McVey D. S., & Rich J. A. 2016. A recombinant Rift Valley Fever virus glycoprotein subunit vaccine confers full protection against Rift Valley Fever challenge in sheep. *Sci Rep*. DOI: 10.1038/srep27719

Freund, A. 2021. COVID-19: Risks and side effects of vaccination. Deutsche Welle. Disponible en: <https://p.dw.com/p/3nXhM>

Gandhi M., Yoke D. S., & Havlir D. V. 2020 Asymptomatic transmission, the Achilles' heel of current strategies to control COVID-19. *N Engl J Med*. 382: 2158 - 2160. DOI: 10.1056/NEJMe2009758

Gauci C., Vural G., Öncel T., Varcasia A., Damian V., Kyngdon C. T., Craig P. S., Anderson G. A., & Lightowers M. W. 2007. Vaccination with recombinant

oncosphere antigens reduces the susceptibility of sheep to infection with *Taenia multiceps*. Int J Parasitol. 38(9): 1041 - 1050. DOI: 10.1016/j.ijpara.2007.11.006

González M. A. 2018. Metodología diagnóstica de ovinos y caprinos. 1ra ed. Trillas. México.

González R. G., Torres G. H., & Castillo M. Á. 2014. Ganancia de peso predestete en corderos Pelibuey y sus cruces con Blackbelly, Dorper y Katahdin. Vet Mex 33(4): 443 - 453.

Gorbalenya A. E., Baker S. C., Baric R. S., de Groot R. J., Drosten C., Gulyaeva A. A., Haagmans B. L., Lauber C., Leontovich, A. M., Neuman B. W., Penzar D., Perlman S., Poon L. L. M., Samborskiy D. V., Sidorov I. A., Sola I., & Ziebuhr J. 2020. The species *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus*: clasifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. Nat. Microbiol. 5(4): 536–544. DOI: 10.1038/s41564-020-0695-z

Gerdt V., Wilson H. L., Meurens F., Littel-van den Hurk S. D., Wilson D., Walker S., Wheler C., Townsend H., & Potter A. 2015. Large animal models for vaccine development and testing. ILAR J. 56(1): 53 - 62. DOI: 10.1093/ilar/ilv009

Hani C., Trieu N. H., Saab I., Dangeard S., Bennani S., Chassagnon G., & Revel M-P. 2020. COVID-19 pneumonia: a review of typical CT findings and differential diagnosis. Diagn Interv Imaging. 101(5): 263 - 268. DOI: 10.1016/j.diii.2020.03.014

Hein W. R., & Griebel P. J. 2003. A road less travelled: large animal models in immunological research. Nat Rev Immunol. 9: 79 - 84. DOI: 10.1038/nri977

Hoffmann M., Kleine-Weber H., Schroeder S., Krüger N., Herrler T., Erichsen S., Schiergens T. S., Herrler G., Wu N-H., Nitsch A., Müller M. A., Drosten C., & Pöhlmann S. 2020. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. Cell. 181(2): 271 - 280. DOI:10.1016/j.cell.2020.02.052

Iqbal A., Tariq K. A., Wazir V. S., & Singh R. 2013. Antiparasitic efficacy of *Artemisa absinthium*, toltrazuril and amprolium against intestinal coccidiosis in goats. J Parasit Dis. 37: 88 - 93. DOI: 10.1007/s12639-012-0137-9

Iwalokun B. A., Efedede B. U., Alabi-Sofunde J. A., Oduala T., Magbagbeola O. A., & Akinwande A. I. 2006. Hepatoprotective and antioxidant activities of *Vernonia amygdalina* on acetaminophen-induced hepatic damage in mice. J Med Food. 9(4): 524 - 530. DOI: 10.1089/jmf.2006.9.524

Jackson M. L. 2007. Hepatobiliary system. En: Jackson M. L., Veterinary clinical pathology: an introduction. Blackwell Publishing. Reino Unido. Pp.: 223 - 245.

Jahangir M. A., Muheem A., & Rizvi M. F. 2020. Coronavirus (COVID-19): History, current knowledge and pipeline medications. Int. J. Pharm. Pharmacol. 4(1): 140. DOI: 10.31531/2581-3080.1000140

Jang S. I., Kim K. K., Lillehoj H. S., Lee H. S., Lee K., W., Bertrand F., Dupuis L., Deville S., Arous J B., & Lillehoj E. P. 2013. Evaluation of Montanide™ ISA 71 VG adjuvant during profilin vaccination against experimental coccidiosis. PLoS ONE. 8(4): e59786. DOI: 10.1371/journal.pone.0059786

Jang S. I., Lillehoj H. S., Lee S. H., Lee W. K., Lillehoj E. P., Bertrand F., Dupuis L., & Deville S. 2011. Montanide™ ISA 71 VG adjuvant enhances antibody and cell-mediated immune response to profilin subunit antigen vaccinations and promotes protection against *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella*. Exp Parasitol. 127(1): 178 - 183. DOI: 10.1016/j.exppara.2010.07.021

Kashir J., & Yaqinuddin A. 2020. Loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay as a rapid diagnostic for COVID-19. Med Hypotheses. 141: 109786. DOI: 10.1016/j.mehy.2020.109786

Klimka A., Michesl L., Glowalla E., Tosetti B., Krönke M., & Krut O. 2015. Montanide™ ISA 71 VG is advantageous to Freund's adjuvant in immunization against *S. aureus* infection of mice. Scand J Immunol. 81(5): 291 - 297. DOI: 10.1111/sji.12279

Kruger N. J. 2009. The Bradford method for protein quantitation. En: Walker J.M., The protein protocols handbook. Springer Protocols Handbooks. Humana Press, Totowa, NJ. Pp.: 17 - 24

Liu Y. C., Kuo R. L., & Shih S. R. 2020. COVID-19: The first documented coronavirus pandemic in history. Biomed. J. 43(4): 328 - 333. DOI: 10.1016/j.bj.2020.04.007

Magnusdottir A., Johansson I., Dahlgren L.-G., Nordlund P., & Berglund H. 2009. Nat Methods. 6(7): 477 - 478. DOI: 10.1038/nmeth0709-477

Martínez D., Pérez J. M., Sheikboudou C., Debus A., & Bensiad A. 1996. Comparative efficacy of Freund's and Montanide ISA 50 adjuvants for the immunization of goats against heartwater with inactivated *Cowdria ruminantium*. Vet Parasitol. 67(4): 175 - 184. DOI: 10.1016/s0304-4019(96)0104

Mendes R. E., Pérez-Écija R. A., Zagra R., Buffoni L., Martínez-Moreno Á., Dalton J. P., Mulcahy G., & Pérez J. 2010. Evaluation of hepatic changes and local and systemic immune responses in goats immunized with recombinant peroxiredoxin (Prx) and challenged with *Fasciola hepatica*. Vaccine. 28(16): 2832 - 2840. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.01.055

Menter T., Haslbauer J. D., Nienhold R., Savic S., Deigendesch H., Frank S., Turek D., Willi N., Pargger H., Bassetti S., Leuppi J. D., Cathomas G., Tolnay M., Mertz K., & Tzankov A. 2020 Postmortem examination of COVID-19 patients reveals diffuse alveolar damage with severe capillary congestion and variegated findings in lungs and other organs suggesting vascular dysfunction. Histopatol. 77(2): 198 - 209. DOI: 10.1111/his.14134

Miller R., & Englund K. 2020. Clinical presentation and course of COVID-19. Cleve Clin J Med 87(7): 384 - 388 DOI: 10.3949/ccjm.87a.ccc013

Nieuwhof J. G., Bishop S. C., Hill W. G., & Raadsma W. H. 2008. The effect of footrot on weight gain in sheep. Animal 2(10): 1427 - 1436. DOI: 10.1017/s1751731108002619

Noor R. 2020. Obesity and diabetes as the predisposing medical risk factors for the COVID-19 severity. *J Bacteriol Mycol.* 7(7): 1154.

Organización Mundial de la Salud. 2020<sup>a</sup> Novel Coronavirus (2019-nCoV) Situation Report – 22. disponible en: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200211-sitrep-22-ncov.pdf>

Organización Mundial de la Salud. 2021<sup>a</sup>. DRAFT landscape of COVID-19 candidate vaccines - 5 January 2021.

Organización Mundial de la Salud. 2020<sup>b</sup>. Health Emergency Dashboard. Disponible en: <https://covid19.who.int>

Organización Mundial de la Salud. 2021<sup>c</sup>. Vaccines and immunization. Disponible en: [https://www.who.int/health-topics/vaccines-and-immunization#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/vaccines-and-immunization#tab=tab_1)

Organización Mundial de la Salud. 2020<sup>d</sup>. Considerations for evaluation of COVID-19 vaccines for listing by WHO. Disponible en: <https://www.who.int/publications/m/item/considerations-for-the-assessment-of-covid-19-vaccines-for-listing-by-who>

Organización mundial de la salud. 2016. WHO guidelines on clinical evaluation of vaccines: regulatory expectations. Expert committee on biological standardization. Pp: 3 – 24

Pacheco J. 1991. Propedéutica clínica veterinaria. Editorial Continental. México, D.F.

Patil P. K., Bayry J., Ramakrishna C., Hugar B., Misra L. D., Natarajan C. 2002. Immune responses of goats against foot-and-mouth disease quadrivalent vaccine: comparison of double oil emulsions and aluminum hydroxide gel vaccines in eliciting immunity. *Vaccine.* 20(22): 2781 - 2789. DOI: 10.1016/S0264-410X(02)00184-6

Pan Y., Long X., Yi R., & Zhao X. 2018. Polyphenols in liubao tea can prevent CCl<sub>4</sub>-induced hepatic damage in mice through its antioxidant capacities. *Nutrients.* 10: 1280. DOI: 10.3390/nu10091280

Ramírez J. A., 2008. Manual de propedéutica clínica veterinaria en grandes especies y pequeños rumiantes. Manual de apoyo a la docencia. Universidad Nacional Autónoma de México, Edo. de México, México.

Russell K. E., & Roussel, A. J. 2007. Evaluation of the ruminant serum chemistry profile. *Vet Clin Food Anim.* 23: 403 - 426. DOI: 10.1016/j.cvfa.2007.07.003

Sanders J. M., Marguerite L. M., Jodlowski T. Z., & Cutrell J. B. 2020. Pharmacologic treatments for coronavirus disease 2019 (COVID-19): a review. *JAMA.* 323(18): 1824 - 1836. DOI:10.1001/jama.2020.6019

Scheerlinck J.-P. Y., Snibson K. J., Bowles V. M., & Sutton P. 2008. Biomedical applications of sheep models: from asthma to vaccines. *Trends Biotechnol.* 26(5): 256 - 266. DOI: 10.1016/j.tibtech.2008.02.002

Secretaría de Salud. 2020. Se confirma en México caso importado de coronavirus COVID-2019. 077.

Sinnathamby G., Renukaradhya G. J., Rajasekhar M., Nayak R., & Shaila M. S. 2001. Immune responses in goats to recombinant hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of *Peste des petits ruminants* virus: identifications of a T cell determinant. *Vaccine.* 19(32): 4816 - 4823. DOI: 10.1016/S0264-410X(01)00210-9

Soi R. K., Rurangirwa F. R., McGuire T. C., Rwambo P. M., DeMartini J. C., & Crawford T. B. 2010. Protection of sheep against Rift Valley Fever virus and sheep poxvirus with a recombinant capripoxvirus vaccine. *Clin Vaccine Immunol.* 17(12): 1842 - 1849. DOI: 10.1128/CVI.00220-10

Stilwell G., Vieira A., Mattiello S., & Battini M. 20015. AWIN welfare assessment protocol for goats. En: AWIN, AWIN welfare assessment protocol for goats. AWIN project. Unión Europea. Pp.: 21-22. DOI: 10.13130/AWIN\_GOATS\_2015

Wiersinga W. J., Rhodes A., Cheng A. C., Peacock S. J., & Prescott H. C. 2020. Pathophysiology, transmission, diagnosis, and treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *JAMA.* 324(8): 782 - 793. DOI: 10.1001/jama.2020.12839

Wu J., Fan Q., Xia Y., & Ma G. 2015. Uniform-sized particles in biomedical field prepared by membrane emulsification technique. *Chem Eng Sci.* 125(24): 58 - 97. DOI: 10.1016/j.ces.2014.08.016

Yu L., Wu S., Hao X., Dong X., Mao L., Pelechano V., Chen W-H., & Yin X. 2020. Rapid detection for COVID-19 coronavirus using a reverse transcriptional loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) diagnostic platform. *Clin Chem.* 66(7) 975 - 986. DOI: 10.1093/clinchem/hvaa102

Zhang H., Zhou P., Wei Y., Yue H., Wang Y. Hu M., Zhang S., Cao T., Yang C., Li M., Guo G., Chen X., Chen Y., Lei M., Liu H., Zhao J., Peng P., Wang C-Y., & Du R. 2020. Histopathologic changes and SARS-CoV-2 immunostaining in the lung of a patient with COVID-19. *Ann Intern Med.* 172(9): 629 - 632. DOI: 10.7326/M20-0533

Zhang Y., Drapeau S., An H. S., Markova D., Lenart B. A., & Anderson D. G. 2012. Histological features of the degenerating intervertebral disc in a goat disc-injury model. *Spine.* 36(19) 1519 - 1527. DOI: 10.1097/BRS.0b013e3181f60b39

## 15. Apéndice 1 – Equipo, materiales y soluciones

### 15.1. Equipos

- Balanza analítica: AX224 – Sartorius
- Baño maría: W6 – Anova Incorporated
- Báscula colgante: Crane Scale SF-918 – Horizon™
- Biorreactor: Biostat® A, Univessel® Glass 5 L (SW) – Sartorius
- Cabina de flujo laminar nivel II: Class II Biological Safety Cabinet – Esco Airstream®
- Centrífuga clínica: DM0412S – Science Med
- Centrífuga refrigerada: Sorvall ST 40R – Thermo Scientific
- Congelador -20 °C: CV16 – Torrey
- Espectrofotómetro: Genesys™ 10S UV-Vis – Thermo Scientific
- Homogeneizador rotacional: Macsmix™ tube Roator – Miltenyi biotec GmbH
- Incubadora con agitación: MaxQ 4450 – Thermo Scientific
- Lector de placas: iMark™ Microplate Reader – Bio-Rad
- Microscopio: Leica DM2500 – Leica Microsystems
- Potenciómetro: HI2211 – Hanna Instruments
- Refrigerador 4 °C: VDR14 – Torrey
- Agitador ultrasónico: Ultrasonic Processor – Cole-Permer
- Agitador de vórtice: Vortex Mixer S0200 – Labnet International Incorporated

### 15.2. Reactivos

- Adyuvante oleoso: Montanide™ ISA 71 VG – Seppic
- Albúmina sérica bovina: Bio-Rad (Cat. #5000207)
- Ampicilina: USB Corporation (CAS# 7177-48-2)
- Anticuerpo secundario anti-humano: Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG (H+L) – Jackson ImmunoResearch Inc. (cód.: 109-035-003).
- Anticuerpo secundario anti-oveja: Anti-Sheep IgG (whole molecule)-Peroxidase antibody produced in donkey – Sigma-Aldrich (Cat. No.: A3415-1ML)
- Caldo de lisogenia: Broth Miller – US Biological

- Kit para medir alanino aminotransferasa: GPT(ALT)-LQ – Spinreact (ref.: 41272)
- Kit para medir aspartato aminotransferas: GOT(AST)-LQ – Spinreact (ref.: 41282)
- L-arabinosa: Goldbio (CAS# 87-72-9)
- Leche descremada en polvo: Svelty® – Nestle®
- Lisozima de clara de huevo: Sigma-Aldrich (CAS# 12560-88-3)
- Marcador de talla molecular para proteínas: Pierce™ Unstained Protein MW Marker – Thermo Scientific (Cat. No.: 26610)
- Reactivo Bradford: Bio-Rad (Cat. #5000205)
- Tween-20: Polioxietileno-20 – Bio Basic (CAS# 9005-64-5)
- Urea: Jalmek® (CAS# 57-13-6)

### 15.3. Consumibles

- Cloruro de benzalconio: Antibenzil Concentrado – Farmacéuticos Altamirano
- Columna de cromatografía: Ni-NTA Superflow Colum – Qiagen
- Jeringa hipodérmica 3 ml, 23G x 1” – Terumo
- Membrana de celulosa regenerada: Spectra/Por™ 3RC MWCO 3500 daltons – Spectrum™
- Tubo cilindrocónico de polipropileno de 1.5 ml: Axygen™, MCT-150-C
- Tubo cilindrocónico de polipropileno de 15 ml: Nest
- Tubo cilindrocónico de polipropileno de 50 ml: Falcon™, Nest
- Placa de poliestireno de 96 pozos: Costar® - Corning Inc. (CatNo. 3590)
- Sistema vacutainer: tubo 10 ml (REF 367820), aguja 20G x 1.5” (REF 360214) – Vacutainer®

### 15.4. Soluciones

- Solución amortiguadora A: pH 8.00
  - NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM CAS# 7558-79-4
  - Tris · HCl 10 mM CAS# 1185-53-1
  - Urea 8 M CAS#57-13-6
- Solución amortiguadora B: pH 6.30

- $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  100 mM CAS# 7558-79-4
- Tris · HCl 10 mM CAS# 1185-53-1
- Urea 8 M CAS#57-13-6
- Imidazol 50 mM CAS# 288-32-4
- Solución amortiguadora C: pH 4.5
  - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  100 mM CAS# 7558-79-4
  - Tris · HCl 10 mM CAS# 1185-53-1
  - Urea 8 M CAS#57-13-6
- Solución amortiguadora para replegamiento: pH 7.40
  - NaCl 500 mM CAS# 7647-14-5
  - Tris · HCl 20 mM CAS# 1185-53-1
- Solución salina amortiguadora de fosfatos (SSAF): pH 7.40
  - NaCl 137 mM CAS# 7647-14-5
  - KCl 2.7 mM CAS# 7447-40-7
  - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM CAS# 7558-79-4
  - $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.8 mM CAS#7778-77-0
- Solución amortiguadora de carbonatos: pH 9.60
  - $\text{NaHCO}_3$  0.1 M CAS# 144-55-8
  - $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.1 M CAS# 5968-11-6
- Solución de lavado
  - SSAF
  - Tween-20 0.05% (v/v) CAS# 9005-64-5
- Solución de bloqueo
  - Leche descremada en polvo 5% (p/v) en solución de lavado
- Solución diluyente
  - Leche descremada en polvo 1% (p/v) en solución de lavado
- Solución de revelado
  - Citrato de sodio 0.1 M, 50% (v/v) CAS# 6132-04-3
  - Ácido cítrico 0.1 M, 50% (v/v) CAS# 77-92-9
  - $\text{H}_2\text{O}_2$  0.4  $\mu\text{l/ml}$  CAS# 7722-84-1
  - Orto-fenil-diamida (OPD) 4 mg/ml CAS# 95-54-5

## 16. Apéndice 2 – Valores clínicos de referencia para ovinos y caprinos

**Cuadro 15:** Rangos hematológicos de referencia para ovinos y caprinos.

Mesurando	UNIDADES		Ovino	Caprino
	EE.UU.	SI		
Hematocrito	%	$\times 10^{-2}$ l/l	27 – 45	22 – 38
Hemoglobina	g/dl	$\times 10$ g/l	9 – 15	8 – 12
CTE	$\times 10^6$ / $\mu$ l	$\times 10^{12}$ l	9 – 15	8 – 18
VGM	fl	fl	28 – 40	16 – 25
Hgb	pg	pg	8 – 12	5.2 – 8
CMHC	g/dl	$\times 10^9$ g/l	31 – 34	30 – 36
Plaquetas	$\times 10^3$ / $\mu$ l	$\times 10^9$ /l	800 – 1,100	300 – 600
LT	$\times 10^3$ / $\mu$ l	$\times 10^9$ /l	4 – 8	4 – 13
Neutrófilos (segmentados)	%	%	10 – 50	30 – 48
Neutrófilos (banda)	$\times 10^3$ / $\mu$ l	$\times 10^9$ /l	0.7 – 6.0	1.0 – 7.2
Linfocitos	%	%	0	Raro
Monocitos	%	%	40 – 55	50 – 70
Eosinófilos	$\times 10^3$ / $\mu$ l	$\times 10^9$ /l	2 – 9	2 – 9
Basófilos	%	%	0 – 6	0 – 4
	$\times 10^3$ / $\mu$ l	$\times 10^9$ /l	0 – 0.75	0 – 0.55
	%	%	0 – 10	1 – 8
	$\times 10^3$ / $\mu$ l	$\times 10^9$ /l	0 – 1	0.05 – 0.65
	%	%	0 – 3	0 – 1
	$\times 10^3$ / $\mu$ l	$\times 10^9$ /l	0.77 – 1.17	0.7 – 1.0

Tomado de Aiello & Moses, 2016. CTE: conteo total de eritrocitos; VGM: volumen globular medio; Hgb: hemoglobina; CMHC: concentración media de hemoglobina corpuscular; LT: leucocitos totales.

**Cuadro 16:** Perfil hepático de referencia para ovinos y caprinos.

Analito	Unidad	Ovino	Caprino
ALT	U/l	26 – 34	6 – 19
AST	U/l	60 – 280	167 – 513
CK	U/l	8.1 – 12.9	0.8 – 8.9
GGT	U/l	20 – 52	50 – 56
LDH	U/l	238 – 440	123 – 392
SDH	U/l	5.8 – 27.9	14.0 – 23.6
Bilirrubina	mg/dl	0.1 – 0.5	0 – 0.1
Colesterol	mg/dl	52 – 76	80 – 130
Glucosa	mg/dl	50 – 80	50 – 75
PT	g/dl	6.0 – 7.9	6.4 – 7.0
Albúmina	g/dl	2.4 – 3.0	2.7 – 3.9
Globulinas	g/dl	3.5 – 5.7	2.7 – 4.1
NU	mg/dl	8 – 20	10 – 20

Tomado de Aiello & Moses, 2016. ALT: alanino aminotransferasa; AST: aspartato aminotransferasa; CK: creatinina cinasa; GGT:  $\gamma$ -glutamil transferasa; LDH: lactato deshidrogenasa; SDH: sorbitol deshidrogenasa; PT: proteínas totales; UN: nitrógeno uréico.