



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales



EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD Y SEGURIDAD DE UNA VACUNA
RECOMBINANTE CONTRA LA ENFERMEDAD HEMORRÁGICA VIRAL DEL
CONEJO TIPO 2 (EHVC-2)

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Licenciada en Medicina Veterinaria y Zootecnia

Presenta:

Mariana Rocha Solache

Dirigido por:

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Centro Universitario
Querétaro Qro.
México.



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales de
Información



Evaluación de la inmunogenicidad y seguridad de una
vacuna recombinante contra la Enfermedad
Hemorrágica Viral del Conejo tipo 2 (EHVC-2)

por

Mariana Rocha Solache

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: CNLIN-267561-0123-123



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



EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD Y
SEGURIDAD DE UNA VACUNA RECOMBINANTE CONTRA LA ENFERMEDAD
HEMORRÁGICA VIRAL DEL CONEJO TIPO 2 (EHVC-2)

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Licenciada en Medicina
Veterinaria y Zootecnia

Presenta:

Mariana Rocha Solache

Dirigido por:

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

SINODALES

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito
Presidente

Dr. Diego Josimar Hernández Silva
Secretario

Dra. Xóchitl Zambrano Estrada
Vocal

Dra. Gabriela Aguilar Tipacamú
Vocal

Dr. José Guadalupe Gómez Soto
Vocal

Centro Universitario
Querétaro Qro.
México.

RESUMEN

La Enfermedad Hemorrágica Viral del Conejo tipo 2 (EHVC-2) se presentó por primera vez en México en el año 2020. Este virus no solo afecta al conejo europeo, sino también al conejo americano y a las liebres, generando un peligro mayor para la cunicultura y el equilibrio de los ecosistemas del país. En el Laboratorio de Inmunología y Vacunas de la FCN-UAQ, se desarrolló una proteína quimérica recombinante basada en los epítomos B y T de la proteína VP60 del virus de la EHVC-2, la cual se expresó en un sistema bacteriano y se purificó mediante columnas de afinidad. El objetivo de este trabajo fue evaluar la inmunogenicidad y seguridad de esta proteína como vacuna. Se hicieron cuatro grupos de seis conejos Nueva Zelanda de 8 semanas de edad que se distribuyeron al azar para evaluar tres dosis de antígeno: 20, 40 y 60 µg de proteína emulsionada en un adyuvante comercial y un grupo control inmunizado solo con el adyuvante. Se aplicaron dos dosis por vía subcutánea los días 0 y 21 y se tomaron muestras de sangre sin anticoagulante para la obtención de suero los días: 0, 10, 21 y 31. Se realizó la determinación de anticuerpos mediante la prueba de ELISA indirecta. La seguridad se evaluó a través del monitoreo del estado general, la temperatura rectal y la reactividad de linfonodos regionales, así como mediante el análisis histopatológico de cortes de los siguientes órganos: sitio de inoculación, pulmón, corazón, tráquea, hígado, bazo, órganos reproductores y riñón. Los resultados demuestran que el antígeno vacunal es inmunogénico en conejos, generando anticuerpos detectables después de una primera inmunización y a los 21 días post inmunización (dosis 60 µg) y después de dos inmunizaciones a los 31 días post inmunización (dosis 40 y 60 µg). No se observó diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) entre los tratamientos Tx3 y Tx4 al día 31. No se encontraron alteraciones en el estado general de los animales, observándose únicamente fiebre transitoria y reactividad de linfonodos regionales post vacunación. En la evaluación histopatológica no se encontraron lesiones relacionadas con la administración de la vacuna, a excepción del sitio de inoculación. La dosis más alta de proteína (60 µg) mostró el mejor resultado, siendo capaz de producir anticuerpos específicos a los 21 días a partir de una inmunización. Se concluye que esta vacuna es inmunogénica y segura en conejos, por lo que puede ser evaluada en un desafío controlado. **Palabras clave:** EHVC-2, vacuna, conejo.

SUMMARY

The Rabbit Hemorrhagic Disease Type 2 (RHD-2) was presented for the first time in Mexico in 2020. This virus not only affects european rabbits, but also american rabbit and hares, generating a greater danger for rabbit farming and the balance of the country's ecosystems. A recombinant chimeric protein based on B- and T-cell epitopes of the VP60 protein of rabbit hemorrhagic disease virus type 2 was developed in the Immunology and Vaccines Laboratory of the FCN, expressed in a bacterial system and purified by affinity columns. The objective of this work was to evaluate the immunogenicity of this protein as a vaccine. Three doses of antigen were tested: 20, 40 and 60 ug of protein emulsified in commercial adjuvant and a control group immunized only with the adjuvant. Two doses were administered subcutaneously on days 0 and 21, and serum samples were taken on days 0, 10, 21 and 31. The results show that the vaccine antigen is immunogenic in rabbits, generating specific antibodies from a second vaccine dose, detectable 31 days after immunization. No statistically significant difference ($P < 0.05$) was observed between the experimental treatments Tx3 and Tx4 at day 31. Antibody determination was performed by indirect ELISA test. Safety was assessed through monitoring of general condition, rectal temperature, and regional lymph node reactivity, as well as through histopathological analysis of sections of the following tissues: inoculation site, lung, heart, trachea, liver, spleen, reproductive organs, and kidney. The results show that the vaccine antigen is immunogenic in rabbits, generating detectable antibodies after a first immunization and at 21 days post immunization (60 μg dose) and after two immunizations at 31 days post immunization (40 and 60 μg doses). No significant statistical difference ($P < 0.05$) was observed between the three experimental treatments on day 31. No alterations were found in the general condition of the animals, only transient fever and reactivity of regional lymph nodes were observed. In the histopathological evaluation, no lesions related to the administration of the vaccine were found, except for the inoculation site. The highest dose of protein (60 μg) showed the best result over time, being able to produce specific antibodies 21 days after immunization. It is concluded that this vaccine is immunogenic and safe in rabbits. And can be tested in a controlled challenge.

Key words: RHD, vaccine, rabbits.

DEDICATORIAS

A mis padres, Alejandra Solache Nieto y Salvador Rocha Tapia por su apoyo incondicional y guía durante estos 24 años. Gracias por confiar en mí y hacer posible mi carrera en Medicina Veterinaria y Zootecnia.

A mis abuelos, con los cuales me hubiese gustado compartir este momento.

A mis hermanos: Alejandra, Guadalupe y Salvador por su ejemplo de perseverancia y dedicación.

A mi segunda familia, Christian y Alberto, por su incondicional apoyo en las mejores y peores situaciones; a mi jefe Rolando, mi mejor ejemplo de adulto joven y soporte emocional; a mi hermano Carlos, por compartir 5 años de experiencias a mi lado.

A mis amigas Fernanda y Luz, por acompañarme estos 5 años y siempre creer en mí.

A todos mis profesores, que, a través de sus enseñanzas, consejos, regaños y ejemplo, me inspiran a ser una mejor persona.

AGRADECIMIENTOS

A Fondo de Proyectos Especiales de Rectoría (FOPER) por el financiamiento parcial del presente proyecto a través del FOPER-2021-FCN02411.

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

A la Doctora Xóchitl Zambrano Estrada por su colaboración en la evaluación de las muestras del estudio histopatológico.

A la Ingeniero Elsa Nydia Hernández Ríos de la Unidad de Microscopía del Instituto de Neurobiología de la UNAM por el préstamo de una unidad de microscopía para la toma de las microfotografías.

A mis sinodales, por su invaluable apoyo en la realización de este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio: Aldo, Miguel, Susana, Andrés, Mayra, Juan Carlos, Sergio, Iván y Luis por su invaluable ayuda durante la realización de los experimentos.

A mis compañeros de carrera: Alberto, Christian, Ignacio y Armando por su apoyo durante los muestreos.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	1
SUMMARY	2
DEDICATORIAS	4
AGRADECIMIENTOS	5
I. INDICE DE CUADROS.....	8
II.ÍNDICE DE FIGURAS	9
III.INTRODUCCIÓN	10
IV.JUSTIFICACIÓN	11
V.HIPÓTESIS	12
VI.OBJETIVOS	12
6.1 Objetivo general	12
6.2 Objetivos específicos.....	12
VII.REVISIÓN DE LITERATURA	12
7.1 Definición.....	12
7.2 Etiología	13
7.3 Historia.....	13
7.3.1 EHVC	13
7.3.1 EHVC-2.....	13
7.4 Trasmisión.....	14
7.5 Potencial zoonótico	14
7.6 Periodo de incubación	14
7.7 Patogenia	15
7.8 Signos clínicos	15
7.9 Lesiones en el estudio <i>post mortem</i>	16
7.9.1 Lesiones macroscópicas	16
7.9.2 Lesiones microscópicas.....	16
7.10 Morbilidad y mortalidad.....	16
7.10.1 EHVC.....	16
7.10.2 EHVC-2.....	16
7.11 Diagnóstico	17
7.12 Diagnóstico Diferencial.....	17
7.13 Tratamiento y medidas de control y prevención	18
7.13.1 Tratamiento	18
7.13.2 Control y Prevención.....	18

7.13.2.1 Vacunación.....	18
7.13.2.2 Matanza zoonosanitaria.....	18
7.13.2.3 Desinfección.....	19
7.14 Proteína VP60	19
7.15 Situación actual en el mundo	20
7.15.1 Importancia de los lagomorfos silvestres en el ecosistema	20
7.15.2 Importancia de la cunicultura mundial y nacional	20
7.16 Historia y situación por la EHVC clásica y tipo 2 nacional e internacional	21
7.16.1 EHVC clásica	21
7.16.2 EHVC tipo 2.....	22
7.16.2.1 Producción cunícola	22
7.16.2.2 Liebres y conejos silvestres.....	22
7.17 Vacunas recombinantes.....	22
7.18 Requisitos de aprobación de vacunas de uso veterinario en México	23
VIII. METODOLOGÍA	23
8.1 Obtención del antígeno vacunal	23
8.1.4 Diálisis.....	24
8.1.5 Cuantificación	24
8.2 Animales y alojamiento.....	24
8.3 Conformación de los tratamientos experimentales	24
8.4 Elaboración de dosis vacunales.....	25
8.5 Protocolo de inmunizaciones y toma de muestra de sangre	26
8.5.1 Inmunizaciones.....	26
8.5.2 Toma de muestra de sangre.....	26
8.6 Evaluación de la seguridad de la vacuna.....	27
8.6.1 Monitoreo del estado general	27
8.6.2 Temperatura rectal.....	28
8.6.3 Reactividad de linfonodos regionales.....	28
8.6.4 Alteraciones en el sitio de inoculación.....	28
8.7 Histopatología	29
8.7.1 Toma de muestra de órganos.....	29
8.7.2 Procesamiento de las muestras	29
8.7.3 Análisis.....	30
8.8 Evaluación de la inmunogenicidad de la vacuna.....	30

8.8.1 Protocolo de la técnica de ELISA indirecto	30
8.8.2 Western Blot.....	31
8.8.3 Análisis estadísticos	32
IX.RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
9.1 Obtención del antígeno vacunal y elaboración de las dosis vacunales.....	32
9.2 Western Blot.....	35
9.3 Evaluación de la inmunogenicidad.....	36
9.4 Evaluación de la seguridad.....	38
9.4.1 Monitoreo del estado general	38
9.4.2 Temperatura rectal.....	38
9.4.3 Evaluación macroscópica del sitio de inoculación.....	39
9.4.3 Reactividad de linfonodos regionales.....	42
9.4.4 Evaluación histopatológica	44
9.4.4.1 Sitio de inoculación.....	44
9.4.4.2 Hallazgos histopatológicos.....	48
X.CONCLUSIONES GENERALES	52
XI.CONSIDERACIONES FUTURAS	52
XII.LITERATURA CITADA	53
XIII. ANEXOS.....	62

I. INDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Pruebas oficiales para el diagnóstico de la EHVC-2 en México aprobadas por SENASICA.....	16
Cuadro 2 Tratamientos experimentales.....	24
Cuadro 3 Evaluación diaria del bienestar del conejo.....	27
Cuadro 4 Descripción de las lesiones macroscópicas en el sitio de inoculación.....	40
Cuadro 5 Reactividad de linfonodos regionales.....	42
Cuadro 6 Clasificación de las lesiones en el sitio de inoculación.....	60

II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Electroforesis vertical en gel de poliacrilamida al 12%.....	32
Figura 2	Microfotografía de la emulsión de una vacuna	33
Figura 3	Los sueros de conejos infectados con el VEHC reconocen la proteína recombinante mediante Western Blot.....	34
Figura 4	Producción de anticuerpos específicos.....	36
Figura 5	Comparación estadística entre los tratamientos experimentales a través del tiempo.....	37
Figura 6	Temperatura rectal de conejos de los tratamientos experimentales.....	38
Figura 7	Imágenes representativas de las lesiones macroscópicas en el sitio de inoculación, vista desde el plano subcutáneo.....	39
Figura 8	Tipo de lesión observada a través de la evaluación histopatológica.....	43
Figura 9	Lesiones representativas observadas en el sitio de inoculación durante el examen histopatológico (tinción H&E).....	44
Figura 10	Hallazgos representativos del sitio de inoculación de la vacuna (H&E).....	45
Figura 11	Lesiones observadas en el hígado en el examen histopatológico del hígado..	46
Figura 12	Evaluación histopatológica del hígado (H&E).....	48
Figura 13	Evaluación histopatológica en intestino delgado, imágenes representativas de coccidiosis (H&E).....	49

III. INTRODUCCIÓN

El aporte nutricional que brinda la carne de conejo, así como la facilidad de su manejo, alimentación, producción y aprovechamiento de la piel y pelo, ha permitido que la cunicultura se haya vuelto una actividad pecuaria económicamente favorable dentro del sector rural de nuestro país, siendo una estrategia para el combate contra la desnutrición que aqueja a sectores de bajos recursos (SAGARPA, 2015). La mayor producción cunícola en México se concentra en granjas de traspatio (80% de la producción total), un 15% en granjas semitecnificadas y únicamente el 5% se encuentra en granjas tecnificadas. México ocupa el vigésimo lugar en producción de conejo, con aproximadamente 15 mil toneladas al año (Sistema Producto Cunícola del Distrito Federal, 2012). Aunado a la importancia económica y cultural de la cunicultura, México cuenta con una gran cantidad de especies de conejos y liebres silvestres que forman parte importante de las cadenas alimenticias y en el mantenimiento del equilibrio en los ecosistemas. Actualmente podemos encontrar diez especies de conejos y cuatro de liebres en nuestro país, de las cuales 6 especies de conejos y una especie de liebre son endémicas, por lo que México es reconocido como el país que alberga la mayor diversidad de estos animales (Fernández, *et al.*, 2015; Martínez, *et al.*, 2016; Romero & Cervantes, s.f). En 1973, a nivel nacional se dio inicio a un programa para el fomento de la producción cunícola y por consiguiente, la cunicultura presentó un auge importante dentro del territorio nacional. En el año 1988 el tráfico ilegal de canales de conejos provenientes de China y EUA ocasionó el primer brote de la Enfermedad Hemorrágica Viral del Conejo (EHVC), por lo que se estableció un plan de emergencia donde se aplicó matanza zoonosanitaria a gran parte de la población cunícola del país, provocando que esta actividad pecuaria sufriera un retroceso importante (Sistema Producto Cunícola del Distrito Federal, 2012; SADER, 2020). Fue hasta el 14 de enero de 1993 cuando oficialmente se declara erradicada la EHVC en México (Diario Oficial de la Federación, 1993). La EHVC es una enfermedad aguda, altamente contagiosa y letal que se presenta en los conejos europeos (*Oryctolagus cuniculus*) causada por un calicivirus del género *Lagovirus*, conocido como Virus de la Enfermedad Hemorrágica del Conejo o VEHC (SADER, 2020; Kerr & Vella, 2012; Spickler, 2020). Actualmente existe la variante del virus que da lugar a la enfermedad hemorrágica viral de los conejos tipo 2 (EHVC 2), la cual afecta al conejo europeo, al conejo americano y a la liebre. Por lo tanto, esta enfermedad representa un riesgo sanitario importante tanto

para la actividad cunícola como para los ecosistemas de nuestro país (CPA, 2020). El 9 de abril de 2020 la SENASICA reportó ante la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) el primer caso confirmado de la EHVC-2 en México desde su aparición en 1988. El caso fue reportado en el municipio de Nuevas Casas Grandes, Chihuahua. Derivado de lo acontecido, el 26 de junio del 2020 se activó el Dispositivo Nacional de Emergencia de Sanidad Animal (DINESA) como herramienta para el control y erradicación de la enfermedad (Diario Oficial de la Federación, 2020). Actualmente, cuatro países del continente americano han reportado casos de la EHVC-2: Canadá, Estados Unidos, México y Cuba. En nuestro país, se han reportado casos en los estados de Aguascalientes, Baja California, Baja California Sur, Chihuahua, Ciudad de México, Coahuila, Durango, Estado de México, Hidalgo, Jalisco, Nuevo León, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sonora y Zacatecas (CPA, 2020).

Ante enfermedades emergentes y reemergentes, la vacunación es y será el método de control, prevención y erradicación de enfermedades en humanos y animales más utilizado alrededor del mundo, esto gracias a que resulta ser el sistema más rentable para lograr dichos objetivos (OIE, 2010).

IV. JUSTIFICACIÓN

Las vacunas han permitido el control de más de 20 enfermedades en humanos, y más de 400 enfermedades en animales de granja y silvestres, siendo el método más rentable de prevención (Knight, *et al.*, 2014).

Actualmente en México únicamente se ha aprobado el uso de una vacuna de virus inactivado para la prevención de la EHVC tipo 2. Las desventajas más importantes que presentan este tipo de vacunas es la inmunogenicidad del agente puede verse afectada debido al proceso de inactivación del agente, el requerimiento de una mayor cantidad de antígeno para poder generar una respuesta inmune adecuada y el alto costo de producción (Sanders, *et al.*, 2014; Burrell, *et al.*, 2017). Por otra parte, las vacunas basadas en proteínas recombinantes son seguras debido a que no se trabaja directamente con el agente infeccioso y presentan un bajo costo de producción, permitiendo que sean una opción viable para la prevención de enfermedades (Nascimento & Leite, 2012). El presente estudio permite la evaluación de la seguridad e inmunogenicidad de una vacuna recombinante como candidato para para controlar y prevenir la EHVC-2 con expectativas

de garantizar una cunicultura más sana, permitiendo conservar la biodiversidad de especies de conejos en nuestro país y generando conocimientos que propicien el desarrollo de más proyectos de investigación con respecto a las vacunas y la EHVC-2.

V. HIPÓTESIS

Una vacuna basada en una proteína recombinante con epítomos de la proteína VP60 del Virus Hemorrágico del Conejo tipo 2 es inmunogénica y segura en conejos.

VI. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Evaluar la inmunogenicidad y seguridad de la vacuna desarrollada por la UAQ contra la EHVC-2.

6.2 Objetivos específicos

1. Evaluar la seguridad de la vacuna.
2. Evaluar la inmunogenicidad de la vacuna.
3. Determinar la dosis vacunal ideal.

VII. REVISIÓN DE LITERATURA

7.1 Definición

La Enfermedad Hemorrágica Viral del Conejo (EHVC), conocida también como Enfermedad del Calicivirus del Conejo, Neumonía Hemorrágica o Hepatitis Necrótica infecciosa (Mayer & Donnelly, 2013), es una enfermedad altamente contagiosa y mortal presente en más de 40 países alrededor del mundo. Se presentó por primera vez en China en el año de 1983. Se ha vuelto endémica en diversas regiones de Asia, Europa y África. En América se han presentado diversos brotes en México (1988) y Estados Unidos (2000, 2001 y 2005) a lo largo del tiempo, pero ha logrado ser erradicada. Afecta a conejos domésticos y silvestres de la especie *Oryctolagus cuniculus*. Es causada por el virus de la Enfermedad Hemorrágica Viral del Conejo (VEHC) clásico, también conocido como GI.1 (CFSPH, 2010; Abrantes, *et al.*, 2020). La Enfermedad Hemorrágica Viral del conejo (EHVC) causada por el virus tipo 2 (VEHC-2 / RHDVb / *Lagovirus europaeus*

GI.2) considerada hasta el 2020 como exótica, es una enfermedad reemergente en México con altas tasas de mortalidad y morbilidad, generando pérdidas económicas en la producción cunícola mundial. El virus tipo 2 es filogenéticamente distinto a los miembros del género *Lagovirus*, por lo que se clasifica dentro de un nuevo grupo genético (Abrantes, *et al.*, 2020; Buehler, *et al.*, 2020).

7.2 Etiología

De acuerdo con el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV por sus siglas en inglés), la familia *Caliciviridae* contiene 11 géneros y 13 especies de virus, los cuales miden en promedio entre 27 y 35 nanómetros de diámetro. El género de los *Lagovirus* contiene dos especies: el Virus del Síndrome de la Liebre Parda Europea (SLPE) y el Virus de la Enfermedad Hemorrágica del Conejo (VEHC) (ICTV, 2021; Peñaflor, *et al.*, 2019; Buehler, *et al.*, 2020).

El virus causante de la EHCV-2 pertenece al género de los *Lagovirus* de la familia *Caliciviridae*. Se trata de un virus sin envoltura de ARN monocatenario de sentido positivo. Sus orígenes se estiman entre los años 1870 y 1981, poco antes de su primera aparición en China (Eden, *et al.*, 2015).

7.3 Historia

7.3.1 EHVC

La primera descripción de la EHVC se dio en el año 1983 en China, tras la aparición de animales que presentaban una muerte repentina y en la necropsia mostraban hemorragias en distintos órganos (Liu, *et al.*, 1984). Actualmente se encuentra en distintas regiones del mundo, causando a lo largo del tiempo grandes pérdidas económicas y teniendo un impacto significativo en las especies silvestres (Le Gall, *et al.*, 2013; Velarde, *et al.*, 2017). Debido a la mortalidad que genera esta enfermedad, ha sido utilizada como un agente biológico para el control de conejos silvestres en Australia desde el 2017 (DPIRD, 2021).

7.3.1 EHVC-2

En el año 2010 en Francia se presentaron una serie de casos de conejos tanto silvestres como domésticos afectados por la EHVC, aunque estos últimos se encontraban vacunados

contra la misma (Le Gall, *et al.*, 2013). En el año 2011, se determinó que se trataba de un nuevo grupo genético del virus, denominándolo como VEHC-2. Se han desarrollado varias hipótesis que explican el origen de esta nueva variante, entre las cuales se estipula que puede provenir de un virus no patógeno existente o que se trate de un salto de una especie de *lagovirus* de un huésped reservorio al conejo (Le Gall, *et al.*, 2013). El VEHC-2 posee una homología media del 85% con el VEHC clásico. Debido a las variaciones genéticas que existen entre ambos, se ha demostrado que existe una protección cruzada parcial o casi nula (Le Gall, *et al.*, 2011; Le Gall, *et al.*, 2013; OIE, 2021). A diferencia de la EHVC clásica, se sabe que la EHVC-2 afecta además del conejo europeo, a distintas especies de liebres y ha sido identificado en órganos de otros mamíferos, como en la musaraña (*Crocidura russula*) y en el campañol de pino (*Microtus duodecimcostatus*) (OIE & USDA, 2016).

7.4 Trasmisión

Se ha demostrado que el VEHC puede estar presente en el ambiente hasta tres meses. La transmisión se puede llevar a cabo a través del contacto directo entre animales infectados y susceptibles a través de la exposición a secreciones y excreciones, así como sangre, canales, cadáveres, alimento y agua. Las vías de transmisión incluyen la oral, nasal, conjuntival y parenteral, ésta última si el animal entra en contacto con insectos hematófagos infectados, los cuales son vectores mecánicos del agente infeccioso. Los depredadores y carroñeros que consumieron animales infectados también representan una fuente de transmisión del virus (Lorenzo, *et al.*, 2020; Abrantes, *et al.*, 2012).

7.5 Potencial zoonótico

No existen reportes que indiquen que los lagovirus infecten a los humanos (OIE & USDA, 2016; OIE, 2021).

7.6 Periodo de incubación

Se ha reportado la aparición de los signos clínicos entre tres y nueve días después de la exposición de los animales al VHEC-2 (OIE & USDA, 2016), periodo más largo que el descrito con el VEHC clásico (entre uno y tres días).

7.7 Patogenia

Una vez que el virus se encuentra dentro del organismo, éste se dirige a sus órganos diana: pulmón, hígado y bazo. A través de la proteína VP60, el virus entra en contacto con la fracción carbohidrato del grupo histo-sanguíneo (HBGA por sus siglas en inglés) presentes en la superficie de células epiteliales respiratorias y digestivas superiores. Específicamente, presenta unión a los grupos H tipo 2, A tipo 2 y B tipo 2. Una vez dada la unión virus-célula, se da el proceso de internalización por endocitosis mediada por receptor que precede a la liberación del genoma viral en el citoplasma de la célula (Peñaflor, *et al.*, 2019). Existe infección en los hepatocitos, células de Kupffer, macrófagos alveolares, linfocitos y macrófagos presentes en el bazo y en las células endoteliales. Se sugiere que la diseminación de la progenie viral se da gracias a la capacidad del virus de inducir la muerte celular (Abrantes, *et al.*, 2012).

La replicación del virus trae como consecuencias la degeneración y necrosis de las células, ocasionando una pérdida importante del parénquima y, por lo tanto, la pérdida de la función de los órganos. Debido a que la apoptosis de las células endoteliales genera una actividad procoagulante, se favorece la generación de una coagulación intravascular diseminada (CID), la cual es la causa principal de la muerte del animal. A causa de la infección, en el hígado y bazo se reduce el número de células inmunitarias, lo que ocasiona un estado de inmunosupresión (Alonso, *et al.*, 1998).

7.8 Signos clínicos

En la EHVC se han descrito tres cursos clínicos: hiperagudo, agudo y crónico, teniendo cada uno de ellos signos clínicos característicos. Los animales que cursan la presentación hiperaguda no suelen presentar signos más allá de la muerte repentina. En la presentación aguda las hemorragias son visibles a través de la epistaxis, hematuria y sangrados por la cavidad oral. Se presenta además pirexia (>42 °C), bradicardia y convulsiones como signos neurológicos en algunos casos. La ictericia, anorexia y letargia son evidentes en la presentación crónica de la enfermedad (Harcourt, *et al.*, 2020).

Los signos clínicos que se presentan en la EHVC-2 son muy similares a los causados por el VEHC clásico, siendo prácticamente indistinguibles entre ambas enfermedades e insuficientes para llevar a cabo un diagnóstico, requiriendo del examen *post mortem*,

histopatológico y pruebas complementarias como ELISA, PCR o hemaglutinación (Harcourt, *et al.*, 2020).

7.9 Lesiones en el estudio *post mortem*

7.9.1 Lesiones macroscópicas

Tanto en conejos como liebres, son visibles las hemorragias en el corazón, riñón e hígado principalmente. Se ha observado esplenomegalia y hepatomegalia, éste último de consistencia friable, de un color marrón claro o aspecto más pálido y con un evidente patrón lobulillar (Velarde, *et al.*, 2017; Harcourt, *et al.*, 2020).

7.9.2 Lesiones microscópicas

De manera general, la congestión y hemorragias se encuentran presentes en distintos órganos. Trombos de fibrina se observan con frecuencia en los glomérulos renales. En el hígado es evidente necrosis y apoptosis hepatocelular llegando a tener una distribución multifocal o difusa, con hemorragias y congestión generalizada (Harcourt, *et al.*, 2020). Las lesiones descritas en las liebres son similares a las mencionadas anteriormente, centrándose en el hígado, bazo y riñón principalmente. Al igual que en los conejos, en el hígado se observa necrosis hepatocelular con hemorragias generalizadas (Velarde, *et al.*, 2017; Buehler, *et al.*, 2020).

7.10 Morbilidad y mortalidad

7.10.1 EHVC

La mortalidad reportada en el caso de la enfermedad clásica es de entre el 40 y 100%, donde la mayor parte de la población afectada son los adultos, siendo rara la presentación de la enfermedad en animales menores a 4 semanas de edad. La morbilidad se reporta entre el 30 y 100% (OIE & USDA, 2016).

7.10.2 EHVC-2

En estudios tempranos sobre la enfermedad se sugería que esta, a diferencia del tipo 1 o clásico, era menos virulenta y con una mortalidad de entre el 5% al 70% en conejos infectados de manera experimental. Sin embargo, hay registros de tasas de mortalidad de

hasta el 90% (Le Gall, *et al.*, 2011). Los animales jóvenes, a diferencia de la EHVC, en la EHVC-2 no presentan resistencia a la enfermedad (OIE & USDA, 2016), siendo afectados animales con hasta 11 días de edad.

7.11 Diagnóstico

Existen diversas técnicas descritas tanto para la detección del agente como para la detección de anticuerpos específicos contra el mismo. Técnicas como el Ensayo Inmunosorbente Ligado a Enzima (ELISA), Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), pruebas de Hemaglutinación (HA) y la Microscopía Electrónica elaboradas a partir de tejidos infectados (principalmente el hígado) están descritas para la detección del virus. Las pruebas serológicas incluyen la técnica de ELISA y la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación (OIE, 2021). En México existen tres pruebas diagnósticas oficiales (Cuadro 1) aprobadas por SENASICA para el diagnóstico de la EHVC-2 (CPA, 2020). Éstas únicamente pueden ser efectuadas por laboratorios de Bioseguridad nivel 3 oficiales pertenecientes a la Dirección General de Salud Animal (DGSA) y a la Comisión México-Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los Animales (CPA).

Técnicas diagnósticas	Especificaciones para el envío de muestras		Laboratorio
Hemaglutinación	Tipo de muestra	Cadáver / hígado y bazo	Laboratorios de Bioseguridad Nivel 3
Inhibición de la hemoaglutinación	Envase/contenedor	Bolsa con cierre hermético	
Aislamiento en animales de laboratorio	Temperatura	Refrigeración (4 °C)	

Cuadro 1. Pruebas oficiales para el diagnóstico de la EHVC-2 en México aprobadas por SENASICA (Modificado de CPA, 2020).

7.12 Diagnóstico Diferencial

La mixomatosis, salmonelosis y las enterotoxemias por *Escherichia coli*, *Eimeria stiedae* y *Clostridium* spp., se consideran enfermedades diferenciales para la EHVC-2 al presentar signologías y lesiones similares a esta enfermedad, como la muerte súbita, necrosis hepática y coagulación vascular diseminada (BSAVA, 2014; CPA, 2020; Harcourt, *et al.*, 2020).

7.13 Tratamiento y medidas de control y prevención

7.13.1 Tratamiento

Dadas las características de la enfermedad, no existe tratamiento específico contra la misma.

7.13.2 Control y Prevención

7.13.2.1 Vacunación

De acuerdo con la OIE, (2010) la vacunación es el medio que resulta más rentable cuando se trata de prevenir, controlar y erradicar enfermedades infecciosas en los animales, protegiendo al mismo tiempo la salud pública al mejorar la calidad de vida y bienestar de los animales. La vacunación en animales de granja y compañía es un método de control que se utiliza en países donde la EHVC se considera endémica. Debido a que existe una protección cruzada reducida o nula entre las variantes de virus, al momento de la inmunización de los animales es importante llevar a cabo la identificación del tipo de VEHC presente durante el brote. En el caso de la EHVC se recomienda vacunar únicamente a los animales reproductores, ya que dado el tiempo de vida de los animales de abasto y a la resistencia natural al virus (hasta las 8 semanas de edad) no se considera necesario. El panorama es diferente en el caso de la EHVC-2, ya que la enfermedad afecta a los conejos desde las primeras tres semanas de vida (OIE, 2021). Hasta el momento no hay vacunas comerciales para los animales silvestres, ya que su desarrollo implica el esfuerzo de atrapar, vacunar y liberar a los animales (Lorenzo, *et al.*, 2020). Algunas vacunas únicamente se han probado bajo condiciones de laboratorio y ensayos de campo limitados (Angulo & Bárcena, 2007). Por lo anterior, el lograr la protección de especies silvestres ante enfermedades reemergentes a través de la vacunación sigue suponiendo un reto en todo el mundo.

7.13.2.2 Matanza zoosanitaria

De acuerdo a lo establecido en el plan de emergencia para la atención de un brote de la Enfermedad Hemorrágica Viral del Conejo en los Estados Unidos Mexicanos, todo aquel animal afectado por la EHVC-2, sospechoso o que se haya encontrado en contacto directa o indirectamente a la infección, deberá ser sometido a la matanza zoosanitaria, medida

que se aplica con el fin de evitar que se propague la enfermedad. Una vez que se tiene la indicación por parte de la SADER, se procede a dar muerte a los animales a partir de lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-033-SAG/ZOO-2014, “Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres”, así como el “Manual de procedimientos para el sacrificio humanitario y la disposición sanitaria en emergencias zoonosológicas”. Los cadáveres deben ser incinerados en primera instancia. En caso de que no sea posible la incineración, los cadáveres deben ser enterrados profundamente con la finalidad de evitar la diseminación del virus a través de animales carroñeros y moscas. Todo el proceso de la matanza zoonosológica debe llevarse a cabo dentro de las unidades de producción afectadas, ya que de esta manera se favorece al aislamiento del foco y se previene la diseminación del agente infeccioso (CPA, 2020).

7.13.2.3 Desinfección

Consiste en llevar a cabo procedimientos de descontaminación de aquellos materiales que estuvieron en contacto con el agente infeccioso así como a las instalaciones de la unidad de producción: paredes, suelo, techo, jaulas, nidos, comederos, bebederos, entre otros. El hidróxido de sodio (al 4-10%), la formalina (al 1-2%) y desinfectantes como el hipoclorito de sodio (al 0.5%) han demostrado ser efectivos para la inactivación de los calicivirus (OIE & USDA, 2016; CPA, 2020).

7.14 Proteína VP60

La proteína VP60 es el componente principal de la cápside del VEHC, la cual contiene tres dominios: el brazo N-terminal (NTA), la cubierta (S) que recubre el ARN viral y el saliente o dominio P, el cual se compone de dos subdominios, P1 y P2. El dominio P permite al virus, durante la infección, la unión a la célula huésped, además de ser responsable de la diversidad antigénica (Hu, *et al.*, 2010; Wang, *et al.*, 2013, Bárcena, *et al.*, 2015). Esta proteína ha sido utilizada en ensayos de vacunación como candidata para la prevención de la EHVC y EHVC-2, debido a que se ha demostrado su inmunogenicidad y protección que confiere contra dicha enfermedad. Estos estudios incluyen la evaluación de vacunas de virus y proteínas recombinantes (Cheng, *et al.*, 2013., Bárcena, *et al.*, 2000, Yang, *et al.*, 2015).

7.15 Situación actual en el mundo

7.15.1 Importancia de los lagomorfos silvestres en el ecosistema

Los lagomorfos (liebres, conejos y picas) contribuyen y forman parte importante de los ecosistemas en los que habitan. Son una especie presa para una amplia variedad de carnívoros en todo el mundo, propiciando el aumento y mantenimiento de vertebrados e invertebrados. Además, juegan un papel importante con las especies vegetales al mejorar el ciclo orgánico del suelo y de nutrientes, promoviendo el crecimiento y la estabilidad de comunidades vegetativas (Smith, *et al.*, 2018). De las 63 especies de lepóridos (conejos y liebres) que existen en el mundo, 14 especies se encuentran en México, siendo el país con la mayor biodiversidad y con una distribución por todo el territorio mexicano. De las 14 especies, cuatro pertenecen a las liebres (género *Lepus*) y diez a los conejos (género *Sylvilagus*). De las anteriores, seis especies son endémicas, 10 se encuentran dentro de alguna de las categorías de riesgo establecidas en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 y seis en peligro de extinción de acuerdo a la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN por sus siglas en inglés) (Smith, *et al.*, 2018; Fernández, *et al.*, 2015; SEMARNAT, 2010). Estas especies se encuentran especialmente vulnerables a la EHVC-2, debido al reducido número de ejemplares existentes en la naturaleza y cuya reducción o desaparición del ambiente traería consigo consecuencias de impacto negativo dentro de los procesos ecológicos descritos anteriormente.

7.15.2 Importancia de la cunicultura mundial y nacional

En cuanto a la producción cunícola, el conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*) es la especie más utilizada alrededor del mundo, destacando las razas Nueva Zelanda, California y Chinchilla para la obtención de carne, piel y derivados. En el año 2018, la producción total de carne de conejo mundial fue de 1.394 millones de toneladas, siendo los mayores productores: China, Corea, España y Francia (Wu, 2022). En ese mismo año, México tuvo una producción de 18,297 toneladas, generando una aportación al Producto Interno Bruto (PIB) del sector primario del 0.24%, ocupando el noveno lugar a nivel mundial en producción de carne de conejo y la misma posición en inventario de conejos y liebres, con un valor de 1,406 y 266 millones de pesos, respectivamente (SISS, 2021). Al igual que en distintos países en América Latina, en México se ha impulsado la producción cunícola para el autoconsumo, la comercialización a pequeña escala y a

favorecer la alimentación en el sector rural, por lo que a nivel nacional, la mayor producción cunícola se concentra en granjas de traspatio (80% de la producción total), un 15% en granjas semitecnificadas y únicamente el 5% se encuentra en granjas tecnificadas (Sistema Producto Cunícola del Distrito Federal, 2012; Casanueva, *et al.*, 2013).

Dentro de las principales amenazas que enfrenta la cunicultura se encuentra la introducción de enfermedades exóticas al territorio mexicano (Casanueva, *et al.*, 2013). Es la única enfermedad que afecta a los lagomorfos que se encuentra dentro de la lista oficial de las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos en los Estados Unidos Mexicanos es la EHVC, la cual está dentro del grupo I: “Enfermedades y plagas exóticas que no se encuentran en el territorio nacional, o que han sido erradicadas del país” (DOF, 2018). Como medida para la reducción del riesgo de la EHVC, actualmente no se permite la importación de conejo y sus derivados con fines de comercialización, pero se permite el ingreso a conejos en calidad de compañía o para la investigación (Casanueva, *et al.*, 2013; SAGARPA, 2018).

7.16 Historia y situación por la EHVC clásica y tipo 2 nacional e internacional

7.16.1 EHVC clásica

A consecuencia del tráfico ilegal de canales procedentes de China, se presentó por primera vez la EHVC en el país en el mes de diciembre de 1988, siendo el primer brote en una unidad de producción del estado de Hidalgo, extendiéndose finalmente a otros 13 estados. Como resultado, se realizaron más de 6 mil evaluaciones y más de 3 mil resultaron positivas. Para principios de septiembre de 1990, las muertes por esta enfermedad ascendían a más de 200 mil, generando finalmente pérdidas económicas de más de 53 millones de dólares (SENASICA, s.f).

Al inicio del año 1989, se activó un plan de emergencia a partir del Sistema Nacional de Emergencia de Salud Animal (SINESA, actualmente llamado Dispositivo Nacional de Emergencia de Sanidad Animal, DINESA), con la finalidad de la erradicación de la enfermedad a partir de diferentes medidas: cercos sanitarios para la restricción del comercio y movilización de animales, rifle zoosanitario, desinfección y uso de animales centinelas (SENASICA, 2016). El desconocimiento de esta enfermedad en el país, así como su historia natural y características específicas del agente infeccioso propició que

el combate contra su diseminación en el territorio nacional resultara un reto, misma situación que genera cualquier otra enfermedad exótica (SENASICA, s.f). Después de 22 meses del último reporte de un foco activo, México se declara oficialmente libre de la EHVC en el año 1993 (DOF, 1993). A raíz de la pérdida de gran parte del inventario cunícola, la producción dentro del país se redujo significativamente, afectando severamente su crecimiento a futuro.

7.16.2 EHVC tipo 2

7.16.2.1 Producción cunícola

El impacto que tuvo la EHVC-2 en el país se ha visto reflejado en la pérdida de ejemplares en la vida silvestre y dentro de la producción cunícola. Del año 2020 al 2021 se perdieron 12,612 ejemplares, equivalentes a más de 3 millones de pesos (SISS, 2021). A partir del primer brote registrado en abril del 2020, se han realizado 600 investigaciones por sospecha de EHVC-2 en el país, de las cuales 341 han resultado positivas y 259 negativas. Los estados con mayor número de casos positivos son hasta el momento son: Estado de México (59), Chihuahua (50), Zacatecas (35) y Baja California (33). Las producciones de traspatio han sido las más afectadas, pero también se han presentado focos en producciones comerciales (SISS, 2021).

7.16.2.2 Liebres y conejos silvestres

En el 2021 se reportaron al menos 25 focos de liebres silvestres positivas a la EHVC-2 en 13 estados del país, con el mayor número de casos en Hidalgo (29), Chihuahua (13) y San Luis Potosí (11). Entre las especies afectadas se encuentran liebres endémicas como la liebre antílope de la isla Tiburón (CPA,2021; SISS, 2021; SENASICA, 2021). En noviembre del 2021 se da por terminada la emergencia sanitaria por la EHVC-2 en México, clasificándose actualmente como una enfermedad endémica y manteniéndose bajo vigilancia zoonosológica (PRONABIVE, 2021).

7.17 Vacunas recombinantes

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

& Bolívar, 2021). Para la EHVC y la EHVC-2 se han probado de manera experimental vacunas con tecnología recombinante que han demostrado ser efectivas y conferir protección contra estas enfermedades (Cheng, *et al.*, 2013., Bárcena, *et al.*, 2000, Yang, *et al.*, 2015).

7.18 Requisitos de aprobación de vacunas de uso veterinario en México

La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE por sus siglas en inglés), establece los requisitos de aprobación reglamentaria para el uso de una vacuna con fines veterinarios. En el manual de pruebas diagnósticas y vacunas para animales terrestres. se establece que las pruebas y ensayos de nuevas vacunas deben realizarse únicamente en la especie objetivo, en el caso actual en conejos y liebres, donde los mismos no deben presentar problemas en su estado de salud general durante los ensayos experimentales, así como cambios anormales sistémicos o en el sitio de inoculación. Las vacunas deben pasar por pruebas de seguridad, esterilidad y potencia con la finalidad de demostrar su eficacia y la inexistencia de efectos adversos graves para la salud de los animales (OIE, 2019).

VIII. METODOLOGÍA

La metodología del presente trabajo de investigación se sometió al Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales, la cual fue aprobada bajo el registro 104FCN2021 en la fecha 12 de enero del 2022.

8.1 Obtención del antígeno vacunal

En el Laboratorio de Inmunología y Vacunas de la Facultad de Ciencias Naturales, de la Universidad Autónoma de Querétaro, se generó una proteína quimérica recombinante basada en péptidos que contienen epítomos B y T de la proteína VP60 del VEHC-2. Contiene una cola de polihistidinas para su purificación y tiene un peso molecular estimado de 57.59 kDa Esta proteína fue expresada en un sistema bacteriano y purificada mediante cromatografía de afinidad. En el presente trabajo no se hace mención de detalles, características y secuencia del inmunógeno debido a que se encuentra en trámites de patente.

8.1.4 Diálisis

Dentro de una cabina de flujo laminar nivel II, las fracciones de proteína obtenidas se sometieron a un proceso de diálisis con la finalidad de disminuir la concentración de urea. Las muestras se colocaron en tubos de polipropileno de 1.5 mililitros, los cuales se sellaron con una membrana de nitrocelulosa regenerada entre el borde del tubo y la tapa. Se comenzó con una solución de 400 ml con una concentración de 7.26 M de urea estéril, en la cual se colocaron los tubos en agitación constante. Cada media hora se realizó un recambio de cierto volumen con solución de replegamiento (20 mM Tris HCl, 500 mM NaCl, pH 7.4) y agua destilada. Al finalizar, las muestras se colocaron nuevamente en tubos de 1.5 mililitros, resguardándose a 4 °C hasta su uso.

8.1.5 Cuantificación

La cuantificación de la proteína se realizó por colorimetría (Bradford, 1976), usando el método de Bradford. Se utilizó el reactivo Quick Start™ Bradford Protein Assay Kit 1 (Bio-Rad Laboratories, USA).

8.2 Animales y alojamiento

Se utilizaron 24 conejos de ocho semanas de edad, raza Nueva Zelanda blanco (hembras y machos) provenientes del Área Cunícola de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro (ARCUN-UAQ) sin antecedentes de vacunación contra la EHVC-2. Los animales se alojaron en el módulo de conejos ARCUN-UAQ, el cual se encuentra en la posta zootécnica de la Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia ubicada en el campus Amazcala, El Marqués, Querétaro. Los animales fueron alojados dentro de jaulas tipo americanas de acero galvanizado, ubicadas a un metro del nivel del suelo. Se les brindó agua purificada y alimento comercial balanceado para conejo, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

8.3 Conformación de los tratamientos experimentales

Los conejos fueron aleatoriamente distribuidos en cuatro tratamientos (Tx) experimentales conformados por 6 individuos cada uno:

- Tratamiento 1 (Tx 1): grupo control, inmunizado únicamente con adyuvante comercial (MONTANIDE™ ISA 71).

- Tratamiento 2 (Tx 2): inmunizado con 20 µg de proteína quimérica VHC emulsionada en adyuvante comercial (MONTANIDE™ ISA 71).
- Tratamiento 3 (Tx3): inmunizado con 40 µg de proteína quimérica VHC emulsionada en adyuvante comercial (MONTANIDE™ ISA 71).
- Tratamiento 4 (Tx 4): inmunizado con 60 µg de proteína quimérica VHC emulsionada en adyuvante comercial (MONTANIDE™ ISA 71).

La identificación de los conejos se realizó con tinta indeleble en el pabellón auricular de cada oreja. Se les asignó un número único de identificación precedido con la letra “C”. La distribución de los animales se observa en el cuadro 2.

Tratamiento experimental	ID animal	
Tx 1 Grupo control	C1	C10
	C2	C17
	C9	C18
Tx 2 20 µg de proteína VHC	C3	C12
	C4	C19
	C11	C20
Tx 3 40 µg de proteína VHC	C5	C14
	C6	C21
	C13	C22
Tx4 60 µg de proteína VHC	C7	C16
	C8	C23
	C15	C24

Cuadro 2. Tratamientos experimentales. Distribución de los animales dentro de los tratamientos experimentales (Tx).

8.4 Elaboración de dosis vacunales

La elaboración de las dosis vacunales se realizó en el laboratorio de Inmunología y Vacunas (LINVAS) de la Universidad Autónoma de Querétaro, ubicado en el campus Aeropuerto, Querétaro. Se realizaron un total de 24 dosis vacunales, 6 por cada grupo experimental antes de cada inmunización. Cada dosis contó con proteína quimérica recombinante VHC de acuerdo a la concentración establecida para cada grupo (0, 20, 40 y 60 µg), solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 (PBS) estéril y adyuvante comercial (MONTANIDE™ ISA 71), a excepción del grupo control, para el cual las dosis

vacunales sólo contaron con PBS estéril y adyuvante comercial. Las dosis se elaboraron 24 horas antes de cada inmunización, siendo emulsificadas dentro de una cabina de flujo laminar nivel II, haciendo uso de un mezclador de alto cizallamiento. Primeramente, se adicionó un porcentaje del total de adyuvante en un tubo estéril de 50 mililitros, el cual se sometió a un ciclo de 10 minutos en el mezclador. Posteriormente, las fracciones de proteína quimérica recombinante seleccionadas para la elaboración de las dosis vacunales se diluyeron en PBS estéril, adicionándolas paulatinamente, hasta completar cinco ciclos de 10 minutos cada uno. Se analizó el tamaño de las micelas mediante microscopía, utilizando el objetivo de 1000x aumentos; revisando que el tamaño sea menor a 2 μm como lo indica el fabricante. Esta revisión se realizó después de su elaboración y el día de la inmunización de los animales. El volumen final de cada dosis fue de 1 ml, cargadas en jeringas de 3 ml, con agujas de calibre 22G.

8.5 Protocolo de inmunizaciones y toma de muestra de sangre

8.5.1 Inmunizaciones

Se aplicaron dos inoculaciones, una al día 0 y la segunda al día 21 del experimento. Antes de cada inmunización se aplicó antisepsia en el sitio de inoculación con etanol al 70%. La vacuna se administró de manera subcutánea en la región cervical dorsal.

8.5.2 Toma de muestra de sangre

La toma de muestra sanguínea para la obtención de suero se realizó al día 0, 10, 21 y 31 de experimentación. El método de extracción de sangre para los días 0, 10 y 21 se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito por Gad, (2016) y Pekow, (2012). Utilizando etanol al 70% para la antisepsia, se generó leve irritación en la zona para favorecer la vasodilatación, puncionando la arteria central o las venas marginales auriculares utilizando agujas calibre 22; la recolección de la sangre se realizó en tubos tipo vacutainer rojos de 6 ml. El manejo para la obtención de suero del día 31, así como las muestras de distintos órganos para la evaluación histopatológica, se llevaron a cabo en el taller de matanza ARCUN-UAQ (Ver apartado 8.7.1). El método de aturdimiento y matanza se realizó de acuerdo con lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-33-SAG/ZOO-2014 (Diario Oficial de la Federación, 2015). Se aplicó electroaturdimiento a través de dos electrodos de acero inoxidable colocados sobre la

cabeza previamente mojada, con un voltaje entre 125 y 200 volts con 0.3 amperes por 2 segundos. Una vez aturdido el animal, se colocó boca abajo y sujeto por los miembros pélvicos a la altura del corvejón sobre ganchos de acero inoxidable. Se les dio muerte por desangrado a través del corte de las venas yugulares y arterias carótidas. En este momento se llevó a cabo la recolección de la sangre en tubos estériles de 50 mililitros. Las muestras de sangre se centrifugaron a 1,600 x g por 10 minutos para la obtención del suero, el cual se separó y se realizaron alicuotas del mismo en tubos de 1.5 y 0.2 mililitros, y se resguardó a -20 °C hasta su uso.

8.6 Evaluación de la seguridad de la vacuna

La evaluación de la seguridad de vacunas en ensayos experimentales en conejos incluyen la evaluación de la productividad a través del peso corporal de los animales, el monitoreo del estado de salud a través de la detección de signos que indiquen dolor o enfermedad, evaluación macroscópica del sitio de inoculación en busca de lesión o dolor (abultamientos, eritema, ulceraciones, vocalización al momento de la palpación), y evaluación microscópica, incluyendo otros órganos como pulmón, corazón, hígado, riñón, bazo, duodeno, ovario, útero y linfonodos. Además, se incluyen exámenes complementarios como hemograma o química sanguínea (Powers, *et al.*, 2007). Otros estudios incluyen únicamente la evaluación histopatológica (Macedo, *et al.*, 2013).

En el presente experimento, la seguridad se evaluó a través de cuatro indicadores: 1) monitoreo del estado general, 2) temperatura rectal, 3) reactividad de linfonodos regionales en el sitio de inoculación, así como mediante 4) el análisis histopatológico de cortes del sitio de inoculación, pulmón, corazón, tráquea, hígado, bazo, órganos reproductores y riñón.

8.6.1 Monitoreo del estado general

Se monitoreó el estado general de los animales a través del etograma de comportamiento y la escala de gestos faciales para la evaluación del dolor en conejos descritos por Hampshire & Robertson, (2015) y Keating, *et al.*, (2012). Los parámetros evaluados se describen en el cuadro 3.

Cuadro 3. Evaluación diaria del bienestar del conejo (Traducido de Keating, *et al.*, 2012).

Atributo	Observaciones	Puntaje*
Escala de gestos faciales	Normal / Moderado / Severo	
Postura	Sentado / Agachado / Extendido	
Orejas	Alertas / Normales/ Caídas	
Comportamiento	Juguetón / Curioso / Tímido / Tembloroso	
Vocalización	Normal / Moderado / Severo	
Rechinar de dientes	Normal / Moderado / Severo	
Comiendo	Normal / Reducido / Ausente	
Bebiendo	Normal / Reducido / Ausente	
Defecación	Normal / Reducido / Ausente	
Micción	Normal / Reducido / Ausente	
Acicalamiento	Normal / Reducido / Ausente	
*0, normal; 1, moderado; 2, severo o ausente		

8.6.2 Temperatura rectal

Se monitoreó la temperatura corporal de los animales a través de la temperatura rectal. Se midió en el día 0, 10, 21 y 31 del experimento y después de cada inmunización (día 0 y 21) a las 24 y 48 horas posteriores. El rango de temperatura rectal normal en los conejos se encuentra entre 38 ° y 40 °C (Varga, 2014).

8.6.3 Reactividad de linfonodos regionales

Los linfonodos en los conejos pueden llegar a ser palpados, pero generalmente éstos sólo son identificados cuando el animal cursa por una linfadenopatía asociada a una lesión, enfermedad o a la administración de una vacuna, causas que generan un agrandamiento de los linfonodos y facilitando su palpación.

Se palparon los linfonodos cervicales derecho e izquierdo, que abarcan el territorio linfático del sitio de inoculación (Soto, *et al.*, 2013). Esto se realizó al día 0, 10, 21 y 31 del experimento. El día de la aplicación de cada dosis vacunal (día 0 y 21) también se evaluaron: antes y a las 24 y 48 horas posteriores a su aplicación (día 1, 2, 22 y 23).

8.6.4 Alteraciones en el sitio de inoculación

. Se evaluó el sitio de inoculación en busca de lesiones macroscópicas asociadas a la inmunización, a través de inspección y palpación de la zona. La revisión se realizó el día 0, 10, 21 y 31 del experimento y después de cada inmunización (día 0 y 21), a las 24 y 48 horas.

8.7 Histopatología

La evaluación de los tejidos mediante análisis histológicos, permite su estudio a través de la revisión de estructuras microscópicas, su organización y función (Ross & Pawlina, 2016). Se llevó a cabo el análisis histopatológico de cortes del sitio de inoculación, pulmón, corazón, tráquea, hígado, bazo, órganos reproductores y riñón de los conejos en todos los tratamientos experimentales.

8.7.1 Toma de muestra de órganos

Al día 31 del experimento, se realizó la toma de muestra de órganos para su evaluación histopatológica siguiendo la metodología descrita por Jandete, *et al.* (2013). Una vez muerto el animal, se retiró completamente la piel, se localizó y tomó muestra del sitio de inoculación. Posteriormente, se realizó un corte por la línea media ventral desde la sínfisis púbica hasta la sínfisis mandibular, abarcando el plano muscular y peritoneo dejando expuestos los órganos de la cavidad abdominal; se llevó a cabo la evisceración retirando los intestinos, estómago, hígado y riñones. Posteriormente, realizando un corte a través de la porción cartilaginosa de las costillas se accedió a la cavidad torácica para retirar los pulmones, corazón y tráquea. Por último, se retiraron los órganos reproductivos, ovarios y útero o testículos, según fuese el caso. Los órganos de cada animal se colocaron en charolas individuales para realizar cortes individuales de cada uno en secciones representativas, cuidando que los mismos no tuvieran un grosor mayor a 0.5 centímetros. Las muestras recolectadas se fijaron en formalina amortiguada al 10%, pH 7.4 y respetando la proporción 1:10 órgano-formol.

8.7.2 Procesamiento de las muestras

En el Laboratorio de Patología Veterinaria de la Universidad Autónoma de Querétaro, campus Juriquilla, se realizaron los cortes gruesos de las muestras para su procesamiento dentro de casetes para inclusión. Se siguió el protocolo establecido en Banks, (1996) para la técnica de inclusión en parafina.

Una vez que las muestras de los órganos se encontraron organizadas dentro de los casetes, se deshidrataron en soluciones sucesivas de concentración creciente de alcohol etílico (70°, 90°, 96° y 100°), y se realizó en proceso de aclaramiento con xilol, así como de infiltración con parafina. Este paso se llevó a cabo en un procesador automático de tejidos Leica TP 1020, cuya duración aproximada fue de 12 horas. Al finalizar el

proceso, se formaron bloques con parafina fundida y se dejaron en una platina de enfriamiento Leica EG 1130 hasta que se solidificaron. Con el bloque obtenido se realizaron cortes a 2 micras de grosor en un microtomo Leica RM 2145; los cortes se colocaron en un baño de flotación a 40°C para eliminar restos de parafina, posteriormente fueron adheridos al portaobjetos; para eliminar completamente la parafina, se colocaron en una estufa a 65°C durante 30 minutos y posteriormente se realizó la tinción de Hematoxilina y Eosina (H&E). En algunos casos, se realizó además tinción especial de Tricrómica de Masson y Ácido Peryódico de Schiff (PAS) en hígado y riñón.

8.7.3 Análisis

Las muestras fueron analizadas por dos observadoras independientes, la que suscribe y una Especialista Certificada en Anatomía Patológica Veterinaria de la UAQ, quien realizó un estudio ciego y aleatorizado.

8.8 Evaluación de la inmunogenicidad de la vacuna

La evaluación de la inmunogenicidad de la proteína se llevó a cabo a través de la determinación de anticuerpos mediante el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) indirecto. La evaluación del suero de cada individuo se realizó por triplicado, bajo el siguiente protocolo:

8.8.1 Protocolo de la técnica de ELISA indirecto

Se utilizaron placas de poliestireno de 96 pozos (Costar® - Corning Inc, Plaza Corning, NY, EE.UU. [CatNo. 3590]), las cuales se tamizaron con una concentración de 2 µg/ml de la proteína quimérica, resuspendida en solución de carbonatos (0.1M Na₂CO₃. H₂O, 0.1M NaHCO₃, pH 9.6), colocando 100 µl/pozo. Se incubaron durante toda la noche a 4°C. Se realizaron tres lavados utilizando PBS-T (PBS 1x, Tween 20 0.05%). Se bloquearon las placas utilizando leche al 5% en PBS-T y se incubaron por 1 hora a 37 °C en agitación (200 µl/pozo). Nuevamente se realizaron tres lavados utilizando PBS-T. Se realizaron las diluciones 1:2000 de los sueros en leche al 2% en PBS-T. Se colocaron dichas diluciones por triplicado (100 µl/pozo) y se incubaron por 1 hora a 37 °C en agitación. Se realizaron tres lavados utilizando PBS-T (200 µl /pozo). Se agregó a la placa el anticuerpo secundario (Anti-Rabbit IgG [H+L] Jackson ImmunoResearch, West

Grove, PA, EE.UU.; Code: 711-035-152, diluido 1:6000). Se incubó por 1 hora a 37 °C en agitación. Se realizaron tres lavados utilizando PBS-T. Se colocaron 100 µl de solución de revelado por pozo (0.1 M Na₃C₆H₅O₇, 0.1M C₆H₈O₇, diclorhidrato de ofenilendiamina [0.4 mg/ml], H₂O₂ [0.4 µl/mililitro]) y se leyó la placa a los 20 minutos haciendo uso de un lector de placas (Accuris SmartReader 96, MR9600) a una longitud de onda de 450 nm.

8.8.2 Western Blot

Se realizó la técnica de electro transferencia de proteínas (*Western Blot*) haciendo uso de sueros de animales infectados de manera natural por la EHVC-2. La proteína quimérica recombinante, se separó en un gel de poliacrilamida al 12% a 90V por una hora. Se utilizó el marcador de masa molecular para proteínas Opti-Potrein Ultra Marker ABM (Cat. No.: G623). Posteriormente, se realizó la transferencia semi-seca, colocando en un Trans Blot de abajo hacia arriba: papel filtro (hidratados previamente en búfer de transferencia [Tris 0.048 M, glicina 0.039 M, 20% metanol, pH 8.3]), membrana de nitrocelulosa, gel obtenido en la electroforesis, papel filtro. El proceso tuvo una duración de 17 minutos a 15 V. Una vez terminada la transferencia se confirmó la misma con tinción de Rojo Ponceau (Rojo Ponceau S 0.2%, ácido acético glacial 5%). Se realizó un primer bloqueo con búfer TBS (Tris 20 mM, NaCl 150 mM) y leche descremada al 5% durante toda la noche. Al terminar, se realizaron tres lavados con búfer TBS-T (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0.1% en relación volumen/volumen). Se realizaron las incubaciones del anticuerpo primario (sueros de conejo en dilución 1:1000 y anticuerpo anti-His tag [Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.; Code: MA1-21315] en dilución 1:7500) y secundario (Anti-Rabbit IgG [H+L] Jackson ImmunoResearch, Code: 711-035-152, diluido 1:6000 y Anti-Mouse IgG [H+L] Jackson ImmunoResearch; Code: 115-035-150, diluido 1:5000, acoplados a HRP), diluidos en búfer TBS (Tris 20 mM, NaCl 150 mM) y leche descremada al 2%, por una hora cada uno. Entre estas dos incubaciones se realizaron tres lavados con búfer TBS-T y un bloqueo con búfer TBS y leche descremada al 5%. Se utilizó el kit ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) para el revelado de la membrana.

8.8.3 Análisis estadísticos

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado. El análisis estadístico se hizo mediante el análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Tukey con un 95% de confianza, en el software GraphPad Prism® (versión 8.0 para Windows. San Diego, California, EE.UU.).

IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 Obtención del antígeno vacunal y elaboración de las dosis vacunales

La biomasa contenida en el pellet sometido a extracción fue el resultado de 300 ml de cultivo bacteriano. Se realizó un análisis de la integridad y concentración de la proteína purificada mediante un gel de poliacrilamida obtenido por electroforesis vertical, y de las 50 fracciones obtenidas a partir de la extracción, se seleccionaron las fracciones 39 a 48

para someterse al proceso de diálisis. Una vez terminada la diálisis, se elaboró una electroforesis de las fracciones en un gel de poliacrilamida al 12% (90 V por 130 minutos) teñido con azul de Coomasie (Figura 1) para evaluar nuevamente la conformación y presencia de la proteína quimérica, la cual se observó dentro de su peso molecular (57.59 kDa aproximadamente). Se usó el marcador de masa molecular para proteínas Pierce™ Unstained Protein MW Marker – Thermo Scientific (Cat. No.: 26610). A partir de la cuantificación de proteínas por el método de Bradford, se seleccionaron las fracciones 39 a 42 para la elaboración de las dosis vacunales, confirmando el tamaño y conformación de las micelas a partir de microscopía óptica, como se observa en la imagen 2.

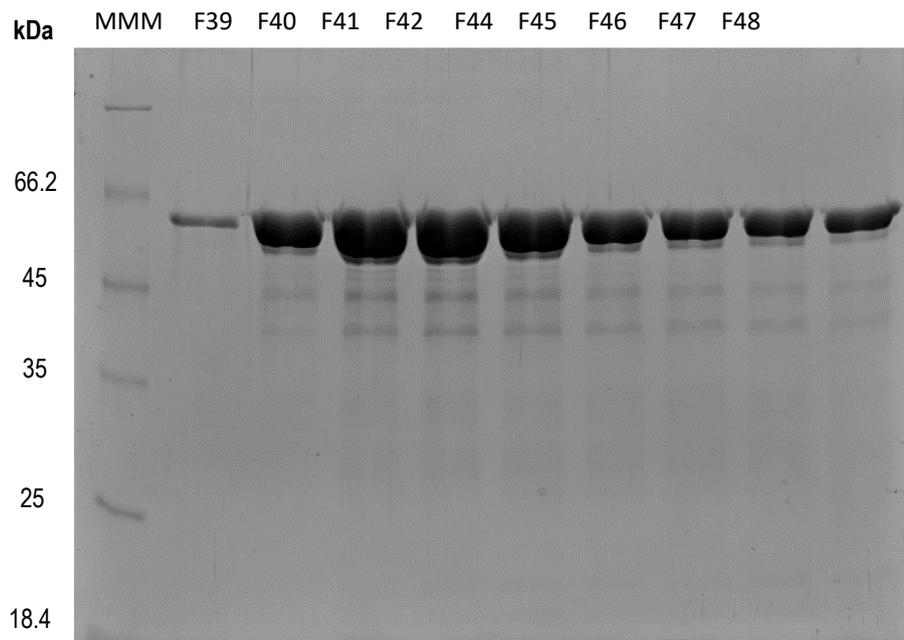


Figura 1. Electroforesis vertical en gel de poliacrilamida al 12% Se observan las fracciones de la proteína quimérica recombinante obtenidas posteriormente al proceso de diálisis.

MMM: marcador de masa molecular; **F:** fracción **MA:** muestra antes de someterse a purificación.

La metodología utilizada para los procesos de extracción y purificación se basó en experimentos previos realizados dentro de LINVAS, por lo cual, para la optimización y mayor rendimiento del antígeno vacunal, es indispensable la estandarización de las técnicas, así como la verificación de la concentración de urea en la muestra después del proceso de diálisis.

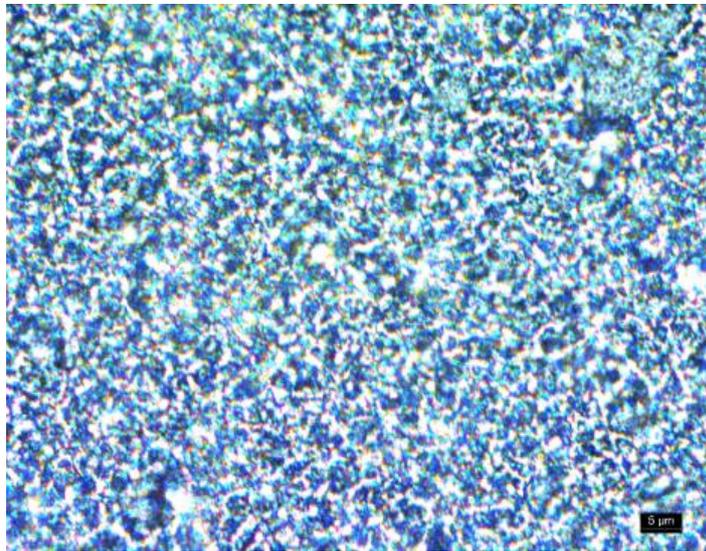


Figura 2. Microfotografía de la emulsión de una vacuna. Se observa el tamaño de las micelas de las dosis vacunales entre 1 y 2 µm de diámetro (1000X).

El adyuvante utilizado en este experimento (MONTANIDE TM ISA 71) es un aceite mineral, el cual se usó para la formación de una emulsión de agua en aceite, que junto con las sales minerales y nanopartículas se clasifica dentro de los adyuvantes considerados como “agentes de liberación”. El rango de proporción de adyuvante presente en la dosis vacunal establecido por el fabricante (SEPPIC, Francia) debe ser entre 50 y 70%, dependiendo de las características esperadas de las mismas. La proporción utilizada en este estudio fue 30:70 (antígeno:adyuvante), misma que ha sido reportada en otros ensayos de vacunación en aves (Jang, *et al.*, 2012; Jang, *et al.*, 2013) y ratones (Klimka, *et al.*, 2015) donde los antígenos vacunales empleados fueron proteínas recombinantes.

9.2 Western Blot

Los resultados del *Western Blot* revelaron que los anticuerpos generados de manera natural en contra del virus de la EHVC-2 reconocen la proteína quimérica recombinante. En la Figura 3, en los carriles S1 a S5 se observa una banda luminiscente entre los pesos moleculares 66 y 52 indicados por el marcador de talla molecular.

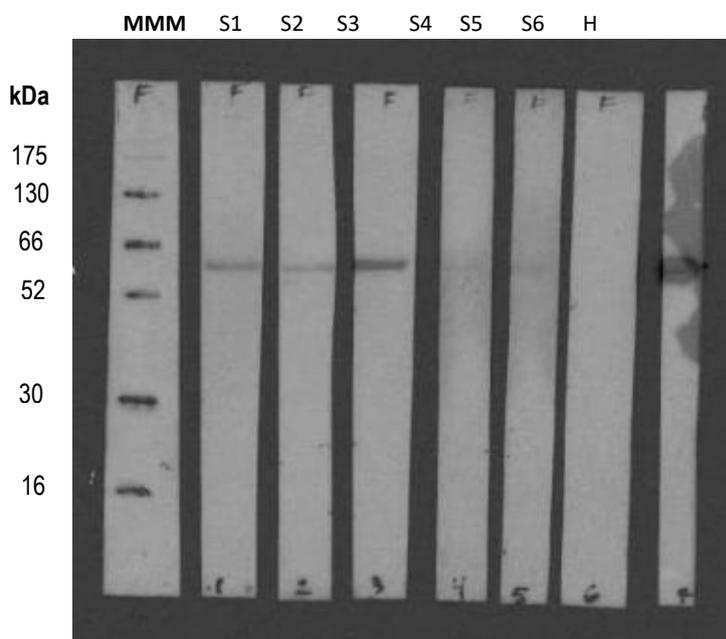


Figura 3. Los sueros de conejos infectados con el VEHC reconocen la proteína recombinante mediante Western Blot. Resultado de la inmunoelectrotransferencia de proteínas (WB) haciendo uso de la proteína quimérica recombinante y sueros positivos a la presencia de anticuerpos contra el VEHC-2.

MMM: marcador de masa molecular; **S1-S5:** sueros de conejos positivos a la EHVC-2; **S6:** suero de conejo negativo a la EHVC-2; **H:** anti-histidina.

Esta técnica permitió determinar que la proteína quimérica VHC es antigénica, ya que interactuó con anticuerpos, productos finales de la respuesta inmunitaria (Zhang & Tao, 2015) en el caso de los conejos positivos a la EHVC-2, mientras que en el conejo S6 (negativo a la EHVC-2) no se evidenció la presencia de bandas. En cuanto al carril anti-histidina (la cual fungió como control positivo), se observó una banda ubicada en el mismo peso molecular (57.59 kDa aproximadamente).

Se sabe que una molécula que es inmunogénica es antigénica, pero una molécula antigénica no es necesariamente inmunogénica, por lo que esta característica no queda implícita en esta técnica y debe ser evaluada a través de la determinación de anticuerpos y pruebas de seguridad y eficacia (De la Torre, 2013; Zhang & Tao, 2015).

9.3 Evaluación de la inmunogenicidad

El análisis de la producción de anticuerpos específicos contra la proteína quimérica VHC se realizó mediante un ensayo de ELISA indirecta e indicó la presencia de anticuerpos en los animales inmunizados con el antígeno (grupos 2, 3 y 4), y su ausencia en el grupo control (grupo 1, Figura 4). El análisis del desempeño individual en cada tratamiento experimental revela los siguientes resultados:

- **Tratamiento control (grupo 1):** No se detectaron anticuerpos específicos a lo largo del experimento, manteniendo una densidad óptica (DO) constante a través del tiempo, sin presentar diferencia estadística significativa ($P < 0.05$).
- **Tratamiento 20 μg proteína VHC (grupo 2):** La densidad óptica de todos los individuos se mantuvo constante a través del tiempo hasta el día 21, sin detectar anticuerpos específicos, con excepción del día 31. En este día se observaron anticuerpos específicos en todos los individuos, teniendo un mejor desempeño tres de ellos y presentando diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) con respecto a los demás días.
- **Tratamiento 40 μg proteína VHC (Tx 3):** No se presentó diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) los días 0, 10 y 21, excepto al día 31 donde se identificaron anticuerpos específicos. A este tiempo, un individuo (C6) presentó baja producción de anticuerpos con respecto a los otros conejos del mismo grupo.
- **Tratamiento 60 μg proteína VHC (Tx 4):** No se presentó diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) entre el día 0 y 10, y no se detectaron anticuerpos específicos en esos días. En cambio, a los días 21 y 31 se observó un incremento de la producción de anticuerpos y una diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) con respecto a los días anteriores, con la detección de anticuerpos específicos en 5 individuos al día 21 y en los 6 al día 31, siendo mayor la DO en este día.

Al realizar un análisis entre todos los tratamientos experimentales se observó que día 0 no existió diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) entre los cuatro tratamientos experimentales (Figura 5) en la D.O. Al día 21 no hay diferencia estadística entre los tratamientos experimentales Tx1, 2 y 3, con excepción del tratamiento 4, donde se observan individuos con anticuerpos específicos. Sin embargo, al día 31 se observa una diferencia estadística entre los tratamientos experimentales 3 y 4 con respecto al grupo

control y al tratamiento experimental 2. Los individuos pertenecientes al tratamiento 4 (60 µg) presentaron la mejor respuesta humoral, al generar anticuerpos específicos a partir de una inmunización y detectables al día 21, existiendo diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) con respecto a los demás tratamientos experimentales en este día. Ensayos de vacunación en conejos realizados en otros estudios han detectado anticuerpos específicos entre la segunda y la tercera semana post inmunización, y un aumento en la producción de anticuerpos después de una segunda inmunización (Cheng, *et al.*, 2013; Bárcena, *et al.*, 2000), cuyos resultados son similares a los obtenidos en este estudio. Asimismo, la proteína estructural de la cápside VP60 se ha utilizado en otros ensayos de vacunación como candidato vacunal para la prevención de la EHVC, debido a que se ha demostrado su inmunogenicidad y protección que confiere contra dicha enfermedad. Estos estudios incluyen la evaluación de vacunas virus y proteínas recombinantes (Cheng, *et al.*, 2013., Bárcena, *et al.*, 2000, Yang, *et al.*, 2015).

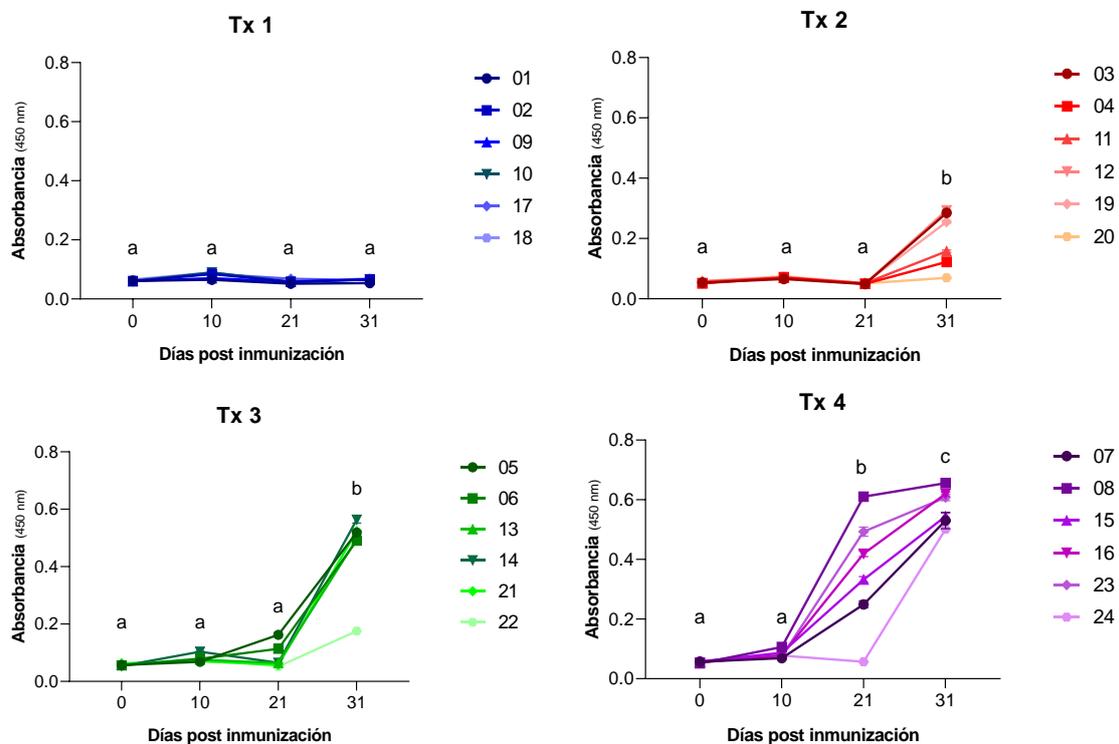


Figura 4. Producción de anticuerpos específicos. Grupos de conejos fueron inmunizados con 0, 20, 40 o 60 µg de proteína y los sueros fueron evaluados mediante ELISA indirecta a los 0, 10, 21 y 31 días post-inmunización.

^{a,b}Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre tratamientos experimentales ($P < 0.05$).

Debido a que el tratamiento experimental 4 (60 μ g) fue en único en presentar anticuerpos específicos en contra de la proteína quimérica recombinante VHC a partir de una dosis y al día 21, se recomienda considerar esta dosis para próximas evaluaciones de la vacuna.

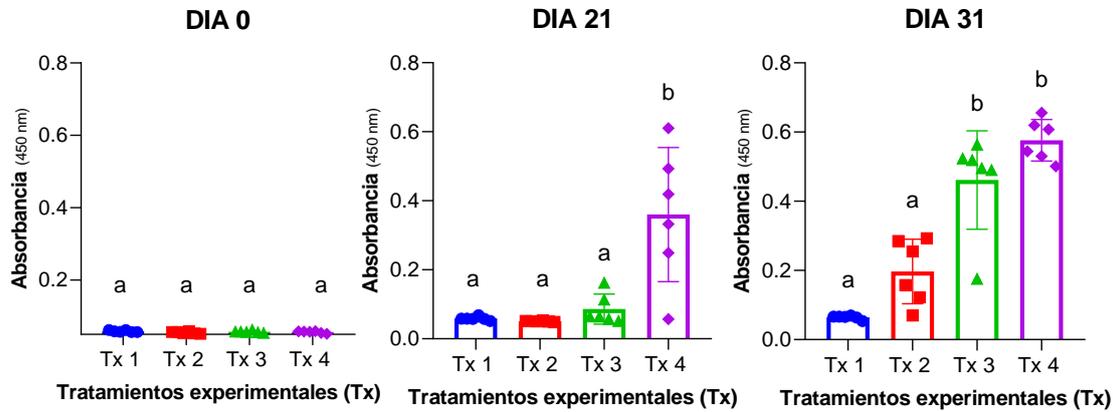


Figura 5. Comparación estadística entre los tratamientos experimentales a través del tiempo. Cada punto representa el valor promedio de un individuo. Las barras indican el valor promedio de cada tratamiento experimental. Se muestra la desviación estándar. ^{a,b} Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre tratamientos experimentales ($P < 0.05$).

9.4 Evaluación de la seguridad

9.4.1 Monitoreo del estado general

Durante el experimento, los animales presentaron un comportamiento normal propio de la especie, caracterizado por un estado de alerta ante estímulos externos y sin la presencia de apatía, depresión, disminución del acicalamiento o algún otro comportamiento que denotara dolor o enfermedad (BSAVA, 2014; Varga, 2014).

De manera general, la condición de los animales se encontró en una escala de 3 o “ideal”, caracterizada por una musculatura bien definida (BSAVA, 2014).

9.4.2 Temperatura rectal

Durante la primera inmunización (día 0, 1 y 2) no se observó un aumento de la temperatura rectal en ninguno de los tratamientos experimentales, manteniéndose dentro de los valores normales establecidos para la especie (entre 38.0 y 40.0 °C) de acuerdo con Varga, (2014). Después de la segunda inmunización, a las 24 horas (día 22) se observó un aumento transitorio de la temperatura rectal de dos animales, cada uno perteneciente al Tx 1 y al Tx 2, con 0.1 y 0.4 °C por arriba del límite superior, respectivamente. A las

48 horas, los valores regresaron nuevamente a los rangos normales (Figura 6). Aunque el rango de temperatura rectal normal establecido en conejos es de entre 38.0 y 40.0 °C, en éste se pueden tener variaciones causadas debido a las condiciones medioambientales o por el estrés por manejo (Suckow & Schroeder, 2012; BSAVA, 2014). Sin embargo, aquellas temperaturas que rebasan los 40.6 °C son consideradas significativamente importantes en el estado de salud del animal (Varga, 2014). En el presente experimento, las elevaciones de temperatura que se reportaron (40.1 y 40.4 °C) no sobrepasan este límite, lo que indica que esta vacuna no genera alteraciones en el estado general de salud de los animales que desencadenen fiebre.

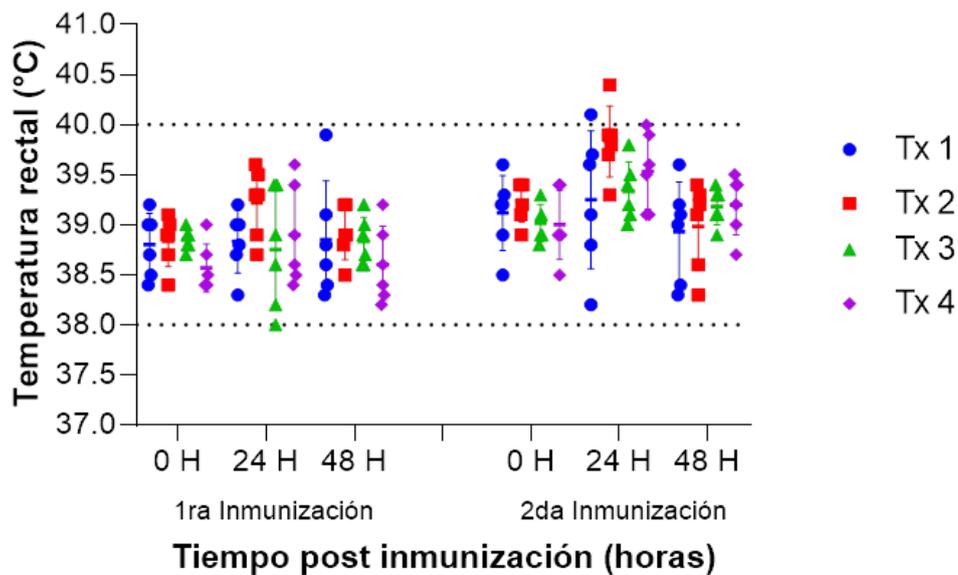


Figura 6. Temperatura rectal de conejos de los tratamientos experimentales. Se muestra la temperatura rectal en grados Celsius de los animales a las 0, 24 y 48 horas posteriores a cada inmunización. Las líneas punteadas representan los límites mínimo y máximo de temperatura rectal basal en los conejos domésticos de acuerdo con Varga, (2014).

9.4.3 Evaluación macroscópica del sitio de inoculación

La evaluación macroscópica del sitio de inoculación incluyó la inspección y palpación de la zona antes de cada inmunización, así como a las 24 y 48 horas posteriores a las mismas, incluyendo al día 31. Durante el experimento, no se observaron cambios aparentes en la zona de inoculación, como pérdida del pelaje, abultamientos, ulceraciones u otras señales que indicaran alguna lesión en la piel.

Al momento de realizar la toma de muestra del sitio de inoculación, éste se evaluó por la zona del tejido subcutáneo, en donde se encontraron pequeños abultamientos de consistencia firme y superficie rugosa, además de zonas de congestión y hemorragia. Estas lesiones se observaron con mayor claridad una vez que la piel se fijó por 48 horas en formalina amortiguada al 10%. Los cambios en el sitio de inoculación (Figura 7) se apreciaron en animales de todos los tratamientos (Tx 2, 3 y 4, incluyendo al grupo control (Tx 1).

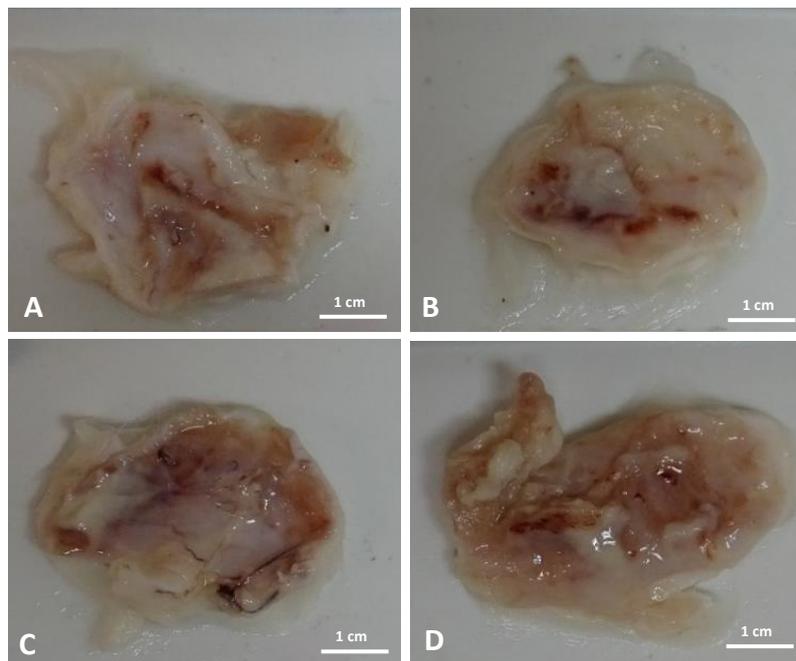


Figura 7. Imágenes representativas de las lesiones macroscópicas en el sitio de inoculación, vista desde el plano subcutáneo. A. Conejo C9 (Tx 1). B. Conejo C3 (Tx 2), C. Conejo C13 (Tx 3). D. Conejo C15 (Tx 4). Se caracterizaron por presentar consistencia firme, superficie irregular, así como, nódulos de aproximadamente un milímetro de diámetro, hiperemia y petequias.

De acuerdo a la tabla de clasificaciones de lesiones subcutáneas por vacunas en conejos (ver Anexo 1) de los autores Leenaars, *et al.*, (1998), la mayor parte de las lesiones registradas en este experimento se clasifican en una puntuación intermedia entre el grado 4 y 6 debido a la extensión de las mismas, ya que no son mayores a 20 cm² (Grado 6) en el Tx 1 (\bar{x} =8.03 cm²), Tx 3 (\bar{x} =9.9 cm²) y Tx 4 (\bar{x} =10.0 cm²), pero en el caso del Tx 2 (\bar{x} =10.6 cm²) es mayor a 10 cm² (grado 4), presentando en todos los tratamiento características del Grado 6, como hiperemia local con zonas de hemorragia menores a 20 cm², pero sin la presencia de lesiones exudativas o úlceras (cuadro 4).

Cuadro 4. Descripción de las lesiones macroscópicas en el sitio de inoculación. Se muestran las medidas (largo x ancho x grosor en cm) de las lesiones en cada tratamiento experimental, así como el tipo de lesión presente.

■ Hemorragia ▲ Hiperemia ◆ Nodulaciones S/L Sin lesión aparente

ID conejos en cada tratamiento experimental (Tx)							
C1	C2	C9	C10	C17	C18		
■ ▲ 1.7 x 0.8	S/L	■ ▲ ◆ 3.4x3.5x0.2	▲ ◆ 1.8x2.4x0.3	S/L	▲ ◆ 4.7x3.1x0.5		
C3	C4	C11	C12	C19	C20		
■ ▲ ◆ 3.8x2.7x0.3	▲ ◆ 3.5x1.5x0.4	■ ▲ ◆ 4.4x4.0x0.2	■ ▲ ◆ 3.7x3.1x0.3	▲ ◆ 2.5x6.1x0.1	▲ ◆ 1.7x2.2x0.7		
C5	C6	C13C	C14	C21	C22		
S/L	S/L	■ ▲ ◆ 4.5x3.4x0.2	■ ▲ ◆ 3.6x3.0x0.4	■ ▲ ◆ 2.0x1.8x0.3	S/L		
C7	C8	C15	C16	C23	C24		
▲ ◆ 2.8x1.7x0.6	■ ▲ ◆ 3.8x2.5x0.3	■ ▲ ◆ 4.4x3.4x0.5	■ ▲ ◆ 4.8x2.8x0.3	S/L	■ ▲ ◆ 2.4x3.1x0.2		

No se observaron diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) en los tamaños de las lesiones entre los tratamientos experimentales y los hallazgos observados concuerdan con lo citado en las referencias científicas.

En ensayos de vacunación en conejos con adyuvantes oleosos emulsionados, se describe la presencia de hiperemia, hemorragias y nodulaciones en la porción subcutánea de la piel, mientras que en los grupos control inmunizados únicamente con antígeno y PBS, las

lesiones se limitan a hiperemia y hemorragia, sin la presencia de nodulaciones (Leenaars, *et al.*, 1994; Leenaars, *et al.*, 1998; Macedo, *et al.*, 2013). La hiperemia patológica es un proceso activo que se caracteriza por una mayor irrigación sanguínea en un sitio que cursa por un proceso inflamatorio. Ésta se encuentra controlada por mediadores químicos de la inflamación, como las prostaglandinas y la histamina, las cuales actúan como vasodilatadores y aumentan la permeabilidad vascular (López, *et al.*, 2017). Cuando la sangre sale de los vasos sanguíneos se denomina hemorragia. Tiene dos orígenes: por rotura del vaso (rexis) o por aumento de la permeabilidad vascular (diapédesis). Las petequias son un tipo de hemorragia que se caracteriza por un tener un tamaño menor a 2 mm (López, *et al.*, 2017). Una causa de lesión traumática vascular desencadenante de inflamación y hemorragia es la aplicación de sustancias a través de agujas, cuyo trauma genera ruptura celular y vascular. Estas lesiones son parte de la reactogenicidad que genera la administración de una vacuna (Hervé, *et al.*, 2019).

9.4.3 Reactividad de linfonodos regionales

Los linfonodos de los conejos son estructuras pequeñas entre 1 y 10 mm de longitud, difíciles de detectar a través de palpación en animales sanos (Dunne, *et al.*, 2002). Previo a la administración de las vacunas, no se lograron identificar los linfonodos cervicales por palpación. Independientemente del tipo de tratamiento, solo en algunos animales se observó reactividad de los linfonodos a las 24 y 48 horas post inmunización. En estos casos, los linfonodos regresaron a su conformación normal ocho días después (cuadro 4). El aumento de tamaño en los linfonodos se debe a la proliferación de células del sistema inmunitario en respuesta a un patógeno. En ellos se facilitan las interacciones entre las células presentadoras de antígeno y los linfocitos T y B (Tizard, 2018; López, *et al.*, 2017). Este hallazgo ha sido reportado en diversos ensayos de vacunación en conejos (Leenaars, *et al.*, 1994; Powers, *et al.*, 2007), destacando en aquellos animales con lesiones más severas en el sitio de inoculación; esto coincide con lo observado en el presente trabajo, aunque no existió diferencia estadística significativa entre las medidas de las lesiones y en la presencia de reactividad de los linfonodos entre grupos, el Tx 2 presentó el promedio más alto (10.6 cm²), siendo éste mismo grupo en el que existieron más animales con linfonodos reactivos durante el experimento.

Grupo	ID animal	Primera inmunización				Segunda inmunización			
		Día 0	Día 1	Día 2	Día 10	Día 21	Día 22	Día 23	Día 31
Tratamiento 1 0 µg proteína quimérica VHC	01	-	-	-	-	-	-	+	-
	02	-	-	-	-	-	-	-	-
	09	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-
	17	-	-	-	-	-	-	-	-
	18	-	-	-	-	-	-	-	-
Tratamiento 2 20 µg proteína quimérica VHC	03	-	-	-	-	-	+	+	-
	04	-	-	-	-	-	-	-	-
	11	-	+	+	-	-	-	+	-
	12	-	-	-	-	-	+	-	-
	19	-	-	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	+	-	-	-	-	-
Tratamiento 3 40 µg proteína quimérica VHC	05	-	-	-	-	-	-	-	-
	06	-	-	-	-	-	-	-	-
	13	-	-	-	-	-	-	-	-
	14	-	-	-	-	-	-	-	-
	21	-	-	-	-	-	-	-	-
	22	-	-	-	-	-	-	-	-
Tratamiento 4 60 µg proteína quimérica VHC	07	-	-	-	-	-	+	+	-
	08	-	-	-	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	-	-	-	-	-
	16	-	-	-	-	-	-	-	-
	23	-	-	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-	-	+	-

Cuadro 5. Reactividad de linfonodos regionales. Se muestran los individuos que presentaron reactividad en los linfonodos cervicales izquierdo y/o derecho de acuerdo con el día de su evaluación.

9.4.4 Evaluación histopatológica

9.4.4.1 Sitio de inoculación

En la evaluación histopatológica de los órganos no se encontraron lesiones relacionadas a la administración de la vacuna, a excepción del sitio de inoculación. En todos los

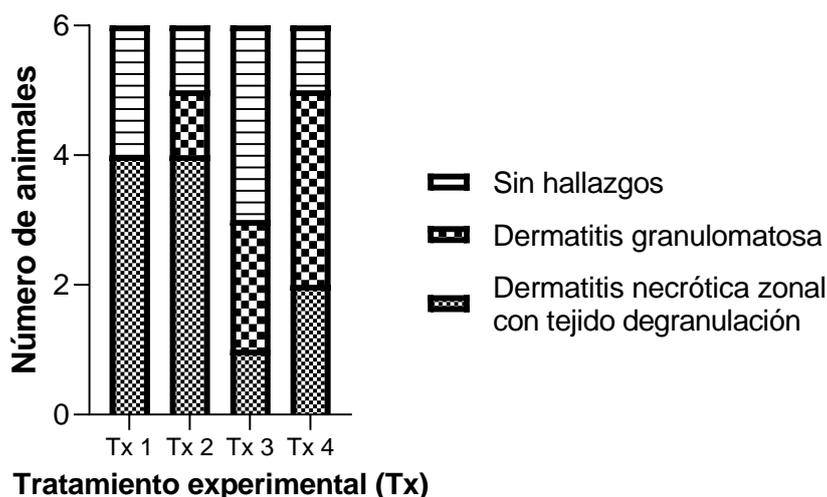


Figura 8. Tipo de lesión observada a través de la evaluación histopatológica. Se muestra en la gráfica el tipo de lesión en los conejos en cada tratamiento experimental, las cuales se resumen en una dermatitis granulomatosa con la presencia o ausencia de necrosis y tejido de granulación.

tratamientos experimentales se observaron dos lesiones significativas, una de ellas fue la dermatitis granulomatosa con diferentes grados de severidad y caracterizada por gran cantidad de macrófagos y vacuolas de diferentes tamaños compatibles con lípidos, así mismo, se encontraron linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos en cantidad variable. La segunda lesión estuvo menos frecuentemente presente acompañando a la dermatitis granulomatosa y consistió en necrosis, en ocasiones con vasculitis leucocitoclástica y tejido de granulación (Figuras 8 y 9).

Cabe destacar que el grupo control presentó lesiones similares, sugiriendo que el origen de estas se debe al adyuvante empleado y/o solución amortiguadora de fosfatos (PBS). Este tipo de lesiones ha sido descrito en otros estudios donde se evaluó el uso de diferentes

tipos de adyuvantes en conejos, incluyendo las emulsiones en aceite, en los cuales se describe necrosis e infiltrado inflamatorio (Macedo, *et al.*, 2013). La necrosis se ha relacionado con la presencia de la vacuna en el tejido, además del trauma tisular generado por la aguja (Powers, *et al.*, 2007). Ante una lesión, el proceso de reparación conlleva a la proliferación de fibroblastos, los cuales producen matrices de colágena. Además, se genera un proceso de angiogénesis a partir de los vasos sanguíneos lesionados dando lugar a vasos sanguíneos de nueva formación (Tizard, 2018). Los adyuvantes que funcionan como agentes de liberación, se caracterizan por formar un efecto de depósito en el sitio de inoculación, preservando la conformación del antígeno y propiciando una liberación prolongada del mismo, logrando una estimulación continua de las células inmunitarias (Burakova, *et al.*, 2018; Spickler & Roth., 2003; Tizard, 2018). El aceite mineral en tejido se congrega en gotas, las cuales, después de ser procesadas a través de deshidratación y aclaramiento a partir de alcoholes y xiloles se pierden, por lo que al ser evaluadas finalmente se aprecian como espacios blancos. Estas vacuolas han sido descritas en otras evaluaciones de emulsiones oleosas de vacunas, donde se le atribuye al aceite procedente

al adyuvante. Los adyuvantes se usan con la finalidad de incrementar la respuesta inmunitaria frente al antígeno presente en la vacuna y su uso puede propiciar la generación de reacciones inflamatorias. Los aceites minerales utilizados como adyuvantes para la elaboración de vacunas son especialmente irritantes y pueden llegar a generar la destrucción del tejido, cuyo daño estimula a las células dendríticas y macrófagos, favoreciendo la respuesta inmune contra el antígeno inoculado (Tizard, 2018; Petrovski;

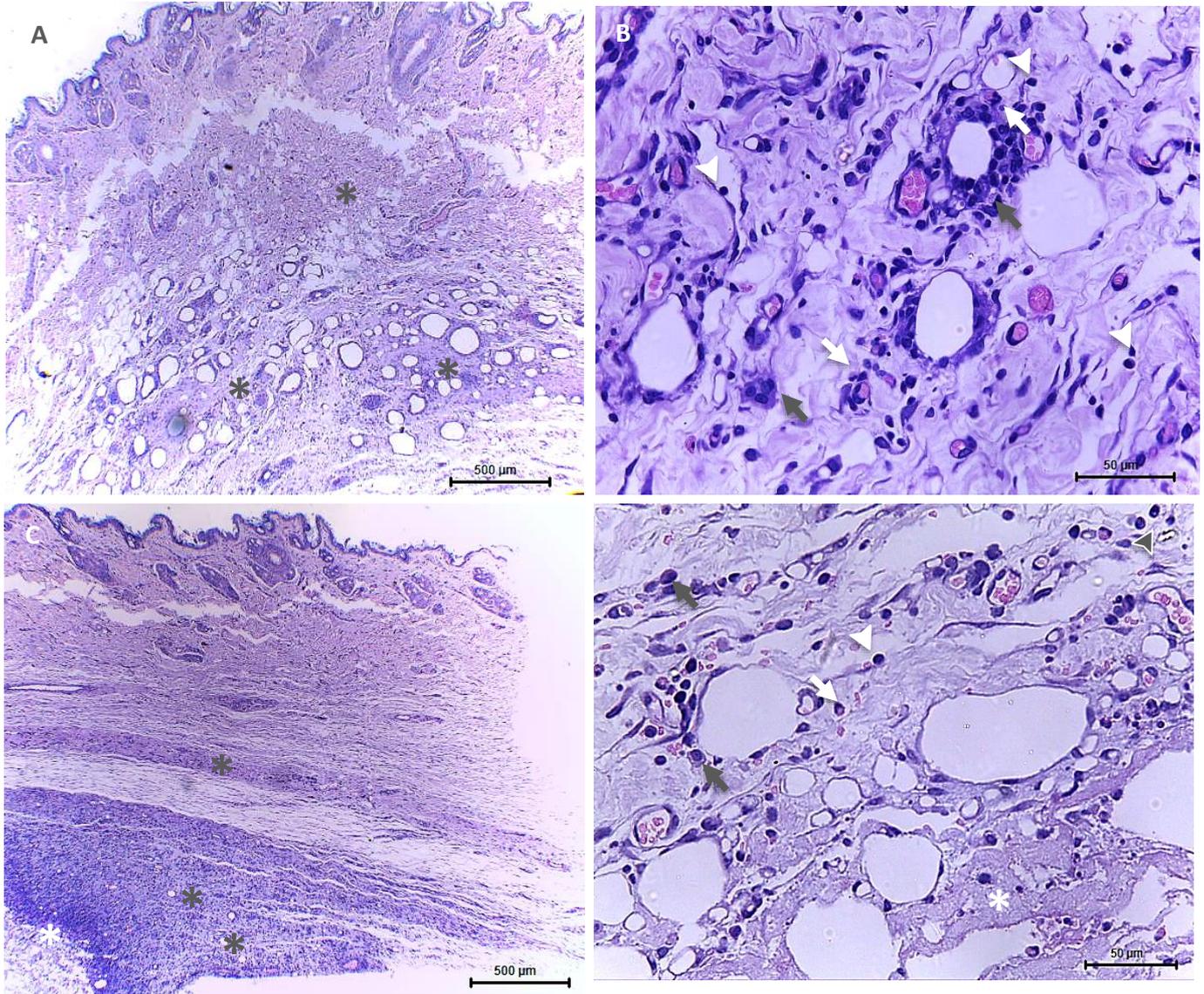


Figura 9. Lesiones representativas observadas en el sitio de inoculación durante el examen histopatológico (tinción H&E). A. Dermatitis granulomatosa (40X). B. Acercamiento de la imagen anterior (400X). C. Dermatitis necrótica (40X). D. Acercamiento de la imagen anterior (400X).

Se señala con un asterisco gris el infiltrado inflamatorio por macrófagos alrededor de vacuolas lipídicas. El asterisco blanco señala las zonas de necrosis. Las flechas grises señalan los macrófagos, mientras que las flechas blancas señalan eosinófilos. Las puntas de flecha blancas señalan linfocitos, mientras que las grises células plasmáticas.

2015). Las reacciones de hipersensibilidad tipo I con respuesta tardía se caracterizan por una gran cantidad de eosinófilos que son atraídos al sitio donde se encuentra el antígeno gracias al factor quimiotáctico de eosinófilo (ECF) liberado por los mastocitos en una reacción inicial (Owen, *et al.*, 2014). Este tipo de reacción da explicación a la gran cantidad de eosinófilos que se identificaron en el sitio de inoculación en el presente estudio (figura 10). La reacción de hipersensibilidad, así como las lesiones descritas en

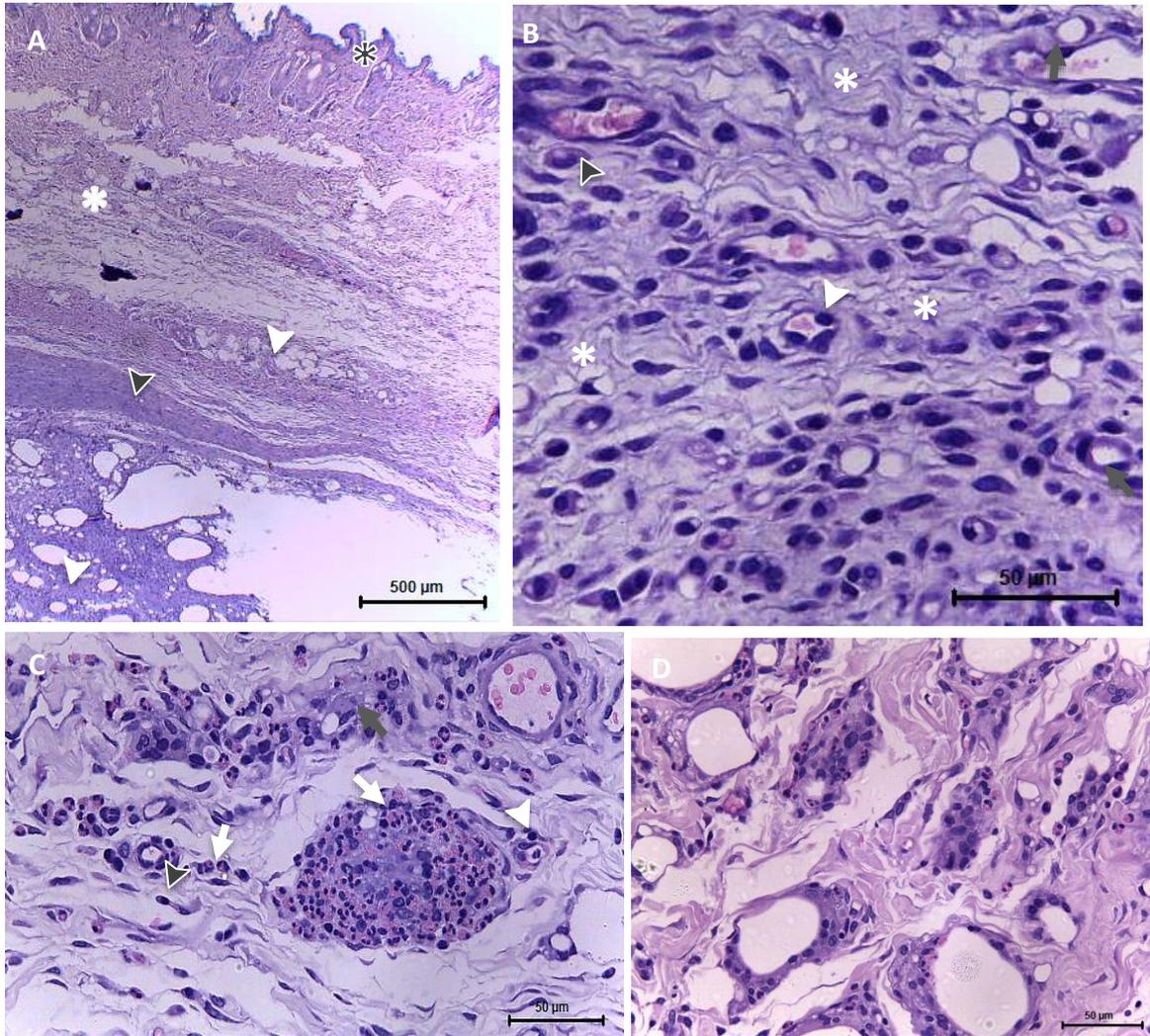


Figura 10. Hallazgos representativos del sitio de inoculación de la vacuna (tinción H&E).

A. Imagen panorámica del sitio de inoculación. Se observa la epidermis (asterisco gris) y la dermis superficial (asterisco blanco). Se observan vacuolas de lípidos (punta de flecha blanca) e infiltrado inflamatorio (punta de flecha gris) (40X). **B.** Se observan vasos de nueva formación (flecha gris), proliferación de tejido conectivo fibroso (asterisco blanco), linfocitos (punta de flecha blanca) y macrófagos (punta de flecha gris) (400X). **C.** Se observa vasculitis leucocitoclástica eosinofílica (400X). Se observan eosinófilos (flecha blanca), células plasmáticas (punta de flecha gris), macrófagos con vacuolas en su interior (flechas grises) y linfocitos (punta de flecha blanca). **D.** Vasculitis.

este estudio se atribuyen al adyuvante utilizado en las dosis vacunales, ya que rara vez los antígenos presentes en las vacunas son causantes de dichas reacciones, atribuyéndoseles generalmente a los demás componentes de las vacunas (McNeil & DeStefano, 2018).

9.4.4.2 Hallazgos histopatológicos

Un hallazgo importante durante la evaluación histopatológica fue la presencia de estructuras compatibles con coccidias en el hígado e intestino delgado en conejos de todos los tratamientos experimentales (Figuras 12 y 13 respectivamente). En algunos casos, las lesiones se evidenciaron durante la evaluación macroscópica como múltiples nodulaciones de consistencia firme y de color blanco en la superficie y parénquima hepático. En la evaluación microscópica de dichas lesiones, se observó una hepatitis periportal linfocitaria con una dilatación severa de los conductos biliares y presencia de estructuras parasitarias ovoides de entre 20 y 30 μm de largo en el epitelio y luz de estos conductos, compatibles con coccidias. En los conductos biliares, además, se observó un infiltrado inflamatorio linfocitario de leve a moderado en la lámina propia. En algunos casos fue evidente la presencia de focos necróticos en el parénquima hepático rodeados por macrófagos, eosinófilos y tejido fibroso, daño atribuido al daño generado por los parásitos (Figura 12). Como puede observarse en la figura 11, únicamente en dos individuos de los 24 totales en experimentación no se encontraron lesiones hepáticas relacionadas con la presencia de coccidias, por lo que la mayor parte de los individuos en todos los tratamientos experimentales se encontraban bajo una infección activa por parásitos. En la imagen 12 se observan los hallazgos en intestino. Las lesiones se caracterizaron por la presencia de parásitos compatibles con coccidias entre el epitelio y en la luz intestinal. En las porciones del duodeno y yeyuno se observó un aumento entre

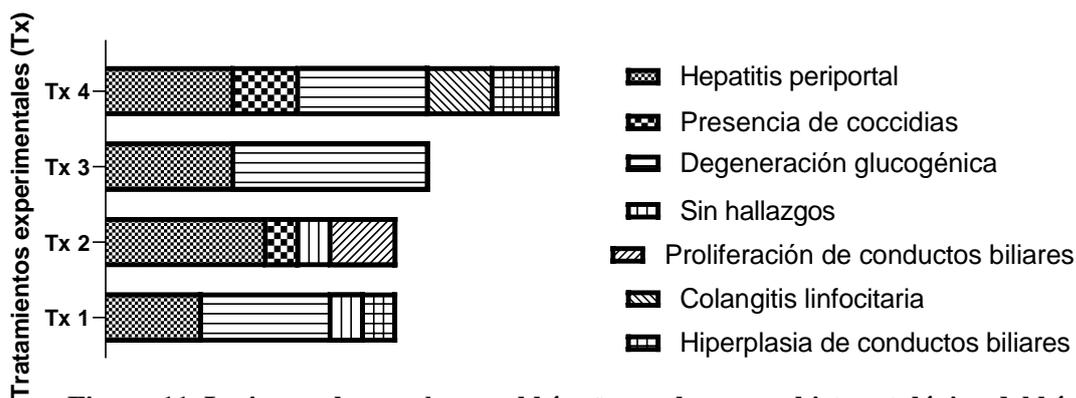


Figura 11. Lesiones observadas en el hígado en el examen histopatológico del hígado.

leve a moderado de los linfocitos intraepiteliales, así como un aumento leve del tejido linfoide asociado a mucosas (TLAM).

La coccidiosis es una de las enfermedades de mayor importancia que afecta a conejos con fines de compañía, producción y para la investigación. De entre la gran variedad de especies que afectan al conejo doméstico, *Eimeria stiedae* es la que genera coccidiosis hepática, debido a que parte de su ciclo de vida se desarrolla en los conductos biliares. A través de la transmisión oro-fecal, migra desde el tracto intestinal (vía linfática o hematológica) hasta los conductos biliares. Los hallazgos histopatológicos asociados a coccidias en este estudio son representativos a lo que se cita en la literatura, aunque puede observarse también un infiltrado inflamatorio alrededor de los conductos biliares compuesto de células plasmáticas, linfocitos, neutrófilos y macrófagos. Se ha descrito que los parásitos pueden encontrarse en el intestino delgado y las lesiones pueden llegar a limitarse al hígado (Pritt, et al., 2012; Duszynski & Couch, 2013). La información anterior respalda el hecho de que las lesiones observadas en el hígado en los distintos tratamientos experimentales tuvieron origen a partir de una coccidiosis hepática y no por un efecto de la vacuna.

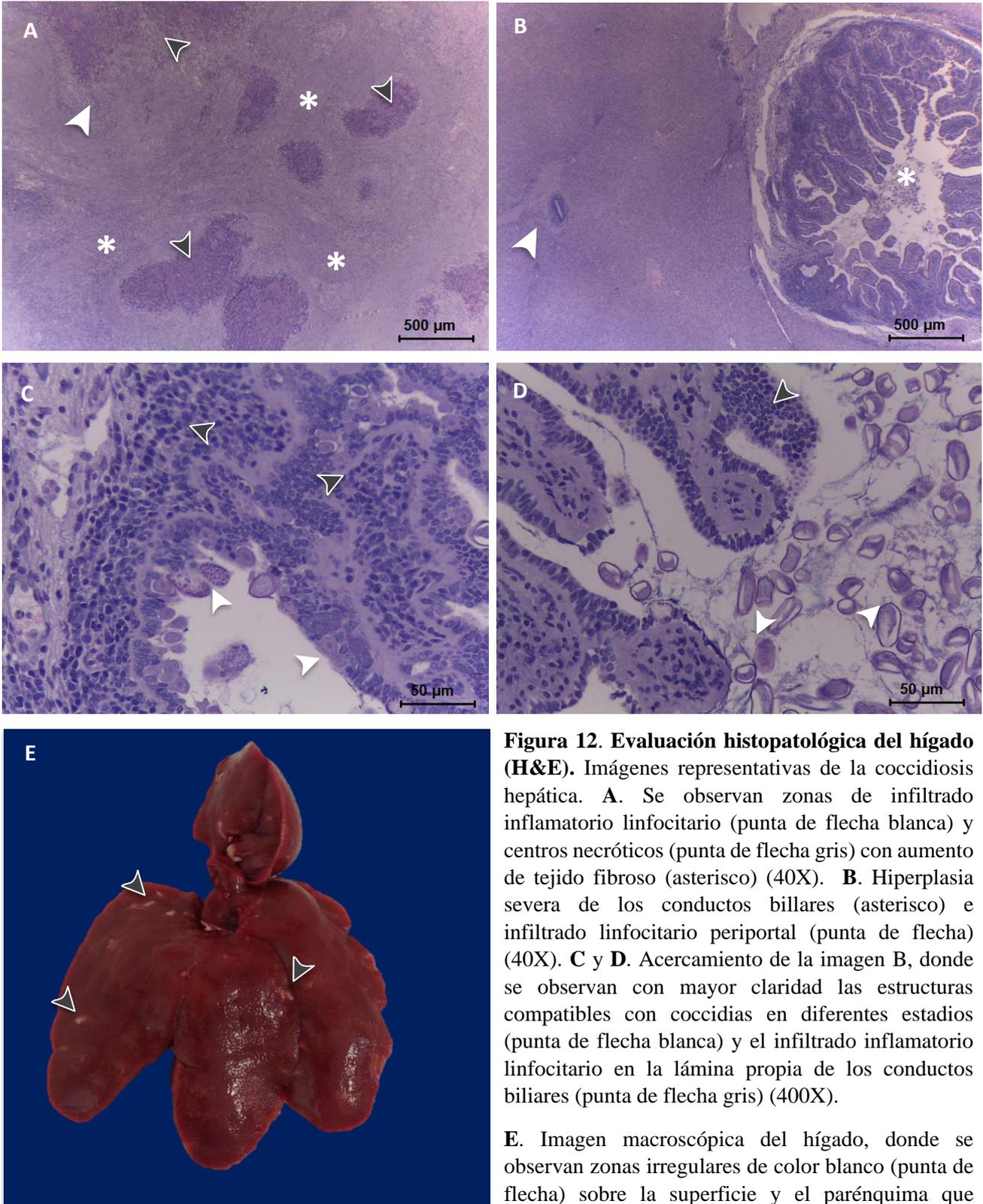


Figura 12. Evaluación histopatológica del hígado (H&E). Imágenes representativas de la coccidiosis hepática. **A.** Se observan zonas de infiltrado inflamatorio linfocitario (punta de flecha blanca) y centros necróticos (punta de flecha gris) con aumento de tejido fibroso (asterisco) (40X). **B.** Hiperplasia severa de los conductos biliares (asterisco) e infiltrado linfocitario periportal (punta de flecha) (40X). **C y D.** Acercamiento de la imagen B, donde se observan con mayor claridad las estructuras compatibles con coccidias en diferentes estadios (punta de flecha blanca) y el infiltrado inflamatorio linfocitario en la lámina propia de los conductos biliares (punta de flecha gris) (400X).

E. Imagen macroscópica del hígado, donde se observan zonas irregulares de color blanco (punta de flecha) sobre la superficie y el parénquima que corresponden a colangitis linfocitaria hiperplásica severa asociada a coccidias.

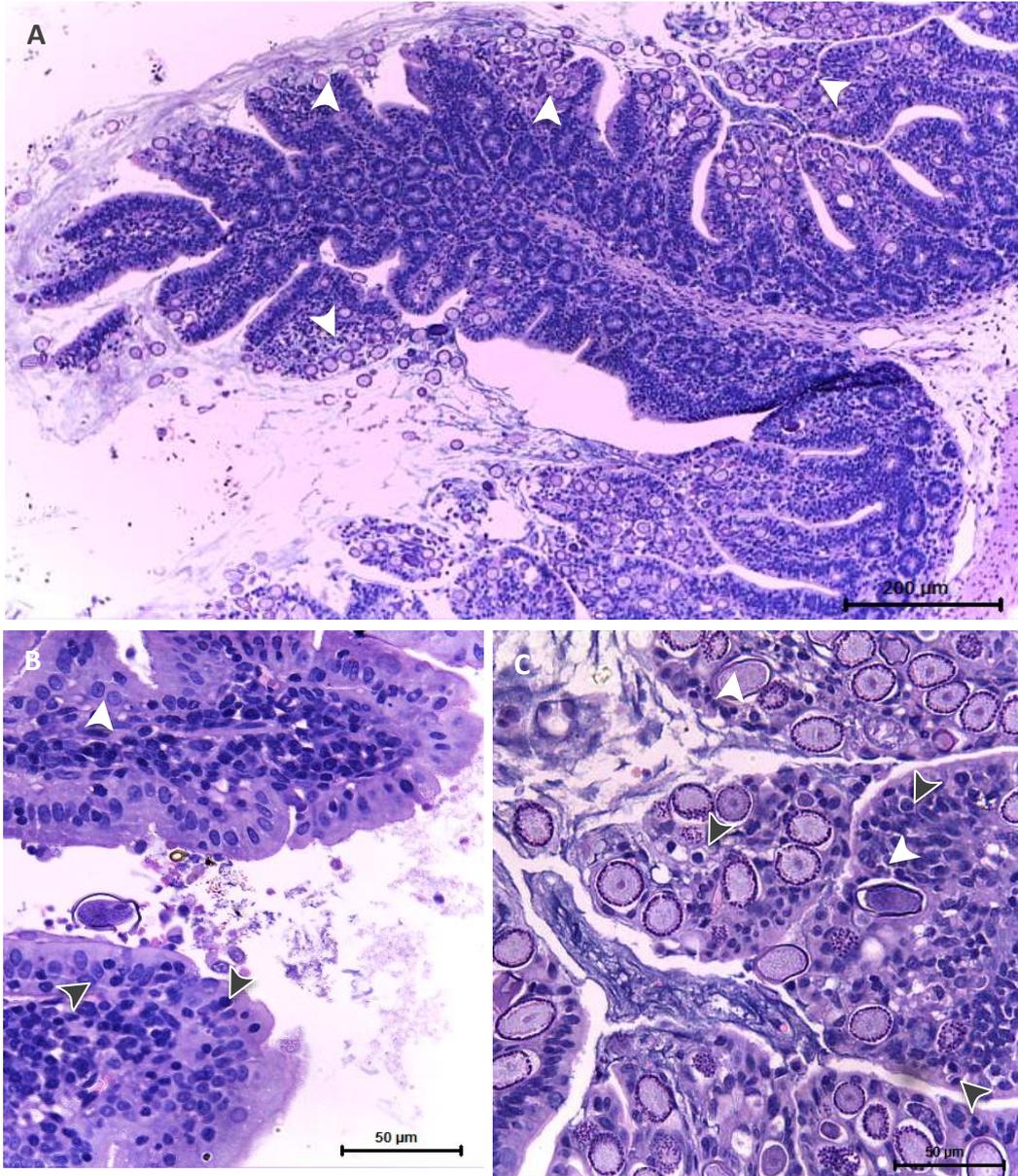


Figura 13. Evaluación histopatológica en intestino delgado, imágenes representativas de coccidiosis (H&E). A. Porción del íleon con presencia de estructuras compatibles a coccidias en el epitelio y lámina propia (punta de flecha) (100X). B y C. Acercamiento de la imagen anterior. Se observan con mayor claridad las coccidias en diferentes estadios así como (punta de flecha blanca), aumento de los linfocitos intraepiteliales (punta de flecha gris) (400X).

X. CONCLUSIONES GENERALES

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

1. El uso de la vacuna es seguro en conejos, sin generar lesiones más allá de lo ya descrito por diferentes autores con respecto a la acción del adyuvante empleado en el sitio de inoculación.
2. Se detectaron anticuerpos específicos en contra de la proteína quimérica recombinante VHC en los tres tratamientos experimentales inmunizados con la misma, por lo que se concluye que es inmunogénica.
3. La dosis de 60 μ g (Tx 4) generó anticuerpos específicos detectables al día 21 con una sola inmunización y al día 31 con una segunda dosis, por lo que se recomienda esta dosis en futuros ensayos.

XI. CONSIDERACIONES FUTURAS

Para un futuro empleo comercial de la vacuna, es necesario llevar a cabo pruebas de desafío en conejos, con la finalidad de determinar el nivel de protección que confiere la vacuna contra la enfermedad. Un factor importante es que este tipo de pruebas sólo pueden llevarse a cabo en laboratorios de seguridad tipo 3.

Para la evaluación de la vacuna en liebres y conejos silvestres, se requiere del desarrollo de estrategias que permitan establecer un protocolo de inmunización que sea rentable y aplicable dentro de los distintos ecosistemas mexicanos.

XII. LITERATURA CITADA

Abrantes, J., Droillard, C., Lopes, A.M., Lemaître, E., Pierrick L., Blanchard, Y., Marchandeau, S., Esteves, P.J., Le Gall, R.G. (2020). *Recombination at the emergence of the pathogenic rabbit haemorrhagic disease virus Lagovirus europaeus/GI.2*. Sci Rep 10, 14502. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71303-4>

Abrantes, J., van der Loo, W., Le Pendu, J., & Esteves, P. J. (2012). *Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review*. Veterinary research, 43(1), 12. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-43-12>

Alonso, C., Oviedo, J. M., Martín-Alonso, J. M., Díaz, E., Boga, J. A., & Parra, F. (1998). Programmed cell death in the pathogenesis of rabbit hemorrhagic disease. Archives of virology, 143(2), 321–332. <https://doi.org/10.1007/s007050050289>

Angulo, E. & Bárcena, J. (2007) *Towards a unique and transmissible vaccine against myxomatosis and rabbit haemorrhagic disease for rabbit populations*. Wildlife Research 34, 567-577

Banks, W.J. (1996). *General principles of Histology*. En: Banks, W.J., Applied Veterinary Histology. Tercera Edición. Pp.: 5-6

Bárcena, J., Guerra, B., González, J., Valcarcel, F., Mata, C., Castón, J., Blanco, E., Alejo, A. (2015). *Comparative analysis of rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) and new RHDV2 virus antigenicity, using specific virus-like particles*. Veterinary research. 46. 106. [10.1186/s13567-015-0245-5](https://doi.org/10.1186/s13567-015-0245-5).

Bárcena, J., Morales, M., Vázquez, B., Boga, J. A., Parra, F., Lucientes, J., Pagès-Manté, A., Sánchez-Vizcaíno, J. M., Blasco, R., & Torres, J. M. (2000). *Horizontal transmissible protection against myxomatosis and rabbit hemorrhagic disease by using a recombinant myxoma virus*. Journal of virology, 74(3), 1114–1123. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.3.1114-1123.2000>

Bradford, M.M. (1976) *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal. Biochem. 72, 248–254.

BSAVA. (2014). *Manual of Rabbit Medicine*. British Small Animal Veterinary Association. ISBN 978 1 905319 49 7

Buehler, M., Jesse, S.T., Kueck, H., Lange, B., Koenig, P.J., Wendy K., Osterhaus, A., Beineke, A. (2020). *Lagovirus europeus GI.2 (rabbit hemorrhagic disease virus 2) infection in captive mountain hares (Lepus timidus) in Germany*. BMC Veterinary Research, 16(1), 166–. doi:10.1186/s12917-020-02386-4

Burakova, Y., Madera, R., McVey, S., Schlup, J. R., & Shi, J. (2018). *Adjuvants for Animal Vaccines*. *Viral immunology*, 31(1), 11–22. <https://doi.org/10.1089/vim.2017.0049>

Casanueva, Z.F.E., Cruz, D.P., Jandete, D.G., Jimenez, C.L.V., Martínez, C.M.A., Mitzi, V.J., Navarro, H.J.A., Vázquez, G.M.C., Villagrán, V.A. (2013). *Medicina y Zootecnia Cunícola II*. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. México.

Cheng, Y., Chen, Z., Li, C., Meng, C., Wu, R., & Liu, G. (2013). *Protective immune responses in rabbits induced by a suicidal DNA vaccine of the VP60 gene of rabbit hemorrhagic disease virus*. *Antiviral Research*, 97(3), 227–231. doi: 10.1016/j.antiviral.2012.12

Cid, R., & Bolívar, J. (2021). *Platforms for Production of Protein-Based Vaccines: From Classical to Next-Generation Strategies*. *Biomolecules*, 11, 1072. <https://doi.org/10.3390/biom11081072>

CPA. (2020). *Plan de Emergencia para la Atención de un Brote de la Enfermedad Hemorrágica Viral del Conejo en los Estados Unidos Mexicanos*. Comisión México – Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los Animales.

Comité Nacional Sistema Producto Cunícola. (2016). *Estadísticas*. Disponible en: <http://sistemaproductocunicola.org.mx/estadisticascunicola.html>. Consultado el 07/08/2022.

CPA (2021). *Boletín Informativo de la CPA. AVISE 10*. https://dj.senasica.gob.mx/Contenido/files/2021/agosto/BoletinAvisse_ED10_Marzo_9379df17-772d-4cd9-b371-5df2411caa4d.pdf

De la Torre, I.L.V. (2013). *Understanding the Immunogenicity Concept*. *Reumatología Clínica (English Edition)*, 9(1), 1–4. doi:10.1016/j.reumae.2012.09.001

Diario Oficial de la Federación (DOF). (1993). *ACUERDO por el que se declara el territorio de los Estados Unidos Mexicanos, libre de la enfermedad hemorrágica viral de los conejos*.

https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4712823&fecha=20/01/1993#gsc.tab=0

Diario Oficial de la Federación (DOF). (2018). *Acuerdo mediante el cual se dan a conocer en los Estados Unidos Mexicanos las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos*. Diario Oficial de la Federación. https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5545304&fecha=29/11/2018#gsc.tab=0

DPIRD. (2021). *Rabbit biocontrol: RHDV1 K5 national release*. Department of Primary Industries and Regional Development's Agriculture and Food division. Australia. Disponible en: <https://www.agric.wa.gov.au/biological-control/rabbit-biocontrol-rhdv1-k5-national-release> Revisado el 09/08/2022.

Dunne, A.A., Plehn, S., Schulz, S., Levermann, A., Ramaswamy, A., B. M. Lippert, B.M., Werner, J.A. (2002). *Lymphnodetopography of the head and neck in New Zealand White rabbits*. Laboratory Animals Ltd. Laboratory Animals (2003) 37, 37–43.

Duszynski, D.W. & Couch, L. (2013). *The biology and identification of the coccidia (apicomplexa) of rabbits of the world*. Elsevier Inc. ISBN: 978-0-12-397899-8

Eden, J. S., Read, A. J., Duckworth, J. A., Strive, T., & Holmes, E. C. (2015). *Resolving the Origin of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus: Insights from an Investigation of the Viral Stocks Released in Australia*. Journal of virology, 89(23), 12217–12220. <https://doi.org/10.1128/JVI.01937-15>

Fernández, J., F. Cisneros., F. Cervantes., A. Melgoza. (2015). Conejos y liebres silvestres de México. Biodiversitas

Harcourt-Brown, N., Silkstone, M., Whitbread, T. J., & Harcourt-Brown, F. M. (2020). *RHDV2 epidemic in UK pet rabbits. Part 1: clinical features, gross post mortem and histopathological findings*. The Journal of small animal practice, 61(7), 419–427. <https://doi.org/10.1111/jsap.13141>

Hampshire, V., & Robertson, S. (2015). *Using the facial grimace scale to evaluate rabbit wellness in post-procedural monitoring*. Lab Animal, 44(7), 259–260. doi:10.1038/lab.an.806

Hervé, C., Laupèze, B., Del Giudice, G. Didierlaurent, M.A., Tavares, S.F (2019). *The how's and what's of vaccine reactogenicity*. npj Vaccines 4, 39. <https://doi.org/10.1038/s41541-019-0132-6>

Hu, Z., Tian, X., Zhai, Y., Xu, W., Zheng, D., & Sun, F. (2010). *Cryo-electron microscopy reconstructions of two types of wild rabbit hemorrhagic disease viruses characterized the structural features of Lagovirus*. *Protein & cell*, 1(1), 48–58. <https://doi.org/10.1007/s13238-010-0007-0>

ICTV. (2021). *Current ICTV Taxonomy Release*. International Committee on Taxonomy of Viruses. Disponible en: <https://ictv.global/taxonomy> Revisado el 09/08/2022

Jandete, D.G.H., G.M.C. Vázquez, C.M.A. Martínez. 2013. *Manual de Prácticas de Medicina y Zootecnia Cunícola I*. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. México

Jang, S. I., Kim, D. K., Lillehoj, H. S., Lee, S. H., Lee, K. W., Bertrand, F., Dupuis, L., Deville, S., Ben Arous, J., & Lillehoj, E. P. (2013). *Evaluation of Montanide™ ISA 71 VG adjuvant during profilin vaccination against experimental coccidiosis*. *PloS one*, 8(4), e59786. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059786>

Jang, S. I., Lillehoj, H. S., Lee, S. H., Lee, K. W., Lillehoj, E. P., Hong, Y. H., An, D. J., Jeong, W., Chun, J. E., Bertrand, F., Dupuis, L., Deville, S., & Arous, J. B. (2012). *Vaccination with Clostridium perfringens recombinant proteins in combination with Montanide™ ISA 71 VG adjuvant increases protection against experimental necrotic enteritis in commercial broiler chickens*. *Vaccine*, 30(36), 5401–5406. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.06.007>

Keating, S. C., Thomas, A. A., Flecknell, P. A., & Leach, M. C. (2012). *Evaluation of EMLA cream for preventing pain during tattooing of rabbits: changes in physiological, behavioural and facial expression responses*. *PloS one*, 7(9), e44437. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044437>

Klimka, A., Michels, L., Glowalla, E., Tosetti, B., Krönke, M. and 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: 291-297. <https://doi.org/10.1111/sji.12279>

Knight-Jones, T. J., Edmond, K., Gubbins, S., & Paton, D. J. (2014). *Veterinary and human vaccine evaluation methods*. *Proceedings. Biological sciences*, 281(1784), 20132839. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.2839>

Knight-Jones, T. J., Edmond, K., Gubbins, S., & Paton, D. J. (2014). *Veterinary and human vaccine evaluation methods*. Proceedings. Biological sciences, 281(1784), 20132839. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.2839>

Kovaliski, John (1998). *Monitoring the spread of rabbit hemorrhagic disease virus as a new biological agent for control of wild european rabbits in Australia*. Journal of Wildlife Diseases, 34(3), 421–428. doi:10.7589/0090-3558-34.3.421

Le Gall-Reculé, G., Lavazza, A., Marchandeu, S., Bertagnoli, S., Zwingelstein, F., Cavadini, P., Martinelli, N., Lombardi, G., Guérin, J. L., Lemaitre, E., Decors, A., Boucher, S., Le Normand, B., & Capucci, L. (2013). *Emergence of a new lagovirus related to Rabbit Haemorrhagic Disease Virus*. Veterinary research, 44(1), 81. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-81>

Le Gall-Reculé, G., Zwingelstein, F., Fages, M.P., Bertagnoli, s., gelfi, j., aubineau, j., roobrouck, a., botti, g., lavazza, a. & marchandeu, s. (2011) *Characterisation of a non-pathogenic and non-protective infectious rabbit lagovirus related to RHDV*. Virology 410, 395-402 doi:10.1016/j.virol.2010.12.001

Le Gall-Reculé, G.; Zwingelstein, F.; Boucher, S.; Le Normand, B.; Plassiart, G.; Portejoie, Y.; Decors, A.; Bertagnoli, S.; Guerin, J.-L.; Marchandeu, S. (2011). *Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France*. Veterinary Record, 168(5), 137–138. doi:10.1136/vr.d697

Leenaars, P., Koedam, M.A., Wester, P.W., Baumans, V., Claassen, E., Hendriksen, C.F. (1998). *Assessment of side effects induced by injection of different adjuvant/antigen combinations in rabbits and mice*. Lab Anim. 1998 Oct;32(4):387-406. doi: 10.1258/002367798780599884. PMID: 9807752

Leenaars, P.P.A.M., Hendriksen, C.F.M., Angulo, A.F., Koedam, M.A., Claassen, E. (1994). *Evaluation of several adjuvants as alternatives to the use of Freund's adjuvant in rabbits*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 40(3), 225–241. doi:10.1016/0165-2427(94)90022-1

Liu, S.J., Xue, X.P., Pu, B.Q., Quian, N.H. (1984). *A new viral disease in rabbits*. Anim Husband Vet Med.16:253–255

López, M.A., Martínez, C.L.A., Martínez, R.I., Salas, G.G., Trigo, T.F.J., Valero, E.G., Vanda, C.B. (2017). *Patología general Veterinaria*. Universidad Nacional Autónoma de México. ISBN: 978-607-02-8931-6

Lorenzo, C., Lafón, T.A., Fernández, J.A., Cervantes, F.A., y Martínez, M.E. (2020). *La enfermedad hemorrágica viral del conejo impacta a México y amenaza al resto de Latinoamérica. Therya, 11(3), 340-345.* <https://doi.org/10.12933/therya-20-1050>

Macedo, L.B., Lobato, Z.I.P., Fialho, S. L., Viott, A.M., Guedes, R.M.C., Silva, C.A. (2013). *Evaluation of different adjuvants formulations for bluetongue vaccine. Brazilian Archives of Biology and Technology, 56(6), 932–941. doi:10.1590/S1516-89132013005000002d*

Mayer, J. & Donnelly, M.T. (2013). *Hemorrhagic Disease. Clinical Veterinary Advisor. W.B. Saunders. Páginas 381-383. ISBN 9781416039693.* <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-3969-3.00169-4>.

McNeil, M. M., & DeStefano, F. (2018). *Vaccine-associated hypersensitivity. The Journal of allergy and clinical immunology, 141(2), 463–472.* <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.12.971>

OIE & USDA. The Center for Food Security & Public Health, Institute for International Cooperation in Animal Biologics, Iowa State University, World Organization for Animal Health (OIE), y United States Department of Agriculture (USDA). (2016). *Rabbit Hemorrhagic Disease. Viral Hemorrhagic Disease of Rabbits, Rabbit Calicivirus Disease.* https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/rabbit_hemorrhagic_disease.pdf Revisado el 08/08/2022.

OIE. (2010). *Areas of interest of focal points: Vaccines. Workshop for OIE national Focal Points for Veterinary Products.* <https://rr-americas.woah.org/wp-content/uploads/2021/04/vaccines.pdf> Revisado el 10/08/2022

OIE. (2019). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2019.* https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.07.02_RHD.pdf [Revisado el 16/08/2022.](https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.07.02_RHD.pdf)

Owen, A.J., Punt, J., Stransford, A.S., Jones P.P. (2014). *Kuby: Inmuología. Séptima edición. Mc Graw Hill Education. ISBN. 978-607-15-1126-3*

Peñaflor-Téllez, Y., Trujillo-Uscanga, A., Escobar-Almazán, J. A., & Gutiérrez-Escolano, A. L. (2019). Immune Response Modulation by Caliciviruses. *Frontiers in immunology, 10, 2334.* <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02334>

Petrovsky N. (2015). *Comparative Safety of Vaccine Adjuvants: A Summary of Current Evidence and Future Needs*. *Drug safety*, 38(11), 1059–1074. <https://doi.org/10.1007/s40264-015-0350-4>

Powers, J., Nash, P., Rhyan, J., Yoder, C.A., Miller, L.A. (2007). *Comparison of immune and adverse effects induced by AdjuVac and Freund's complete adjuvant in New Zealand white rabbits (Oryctolagus cuniculus)*. *Lab Anim* 36, 51–58 <https://doi.org/10.1038/labani1007-51>

Pritt, S., Cohen, K., Sedlacek, H. (2012). *Parasitic Diseases*. En: *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents*. American College of Laboratory Animal Medicine. ISBN: 9780123809209 Pp.: 415-446.

Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONABIVE). (2021). *Concluye la emergencia sanitaria por EHVC T2, continúa la vigilancia y la vacunación*. Disponible en: <https://www.gob.mx/pronabive/es/articulos/concluye-la-emergencia-sanitaria-por-ehvc-t2-continua-la-vigilancia-y-la-vacunacion> Revisado el 04/08/2022

Ross, M. H., & Pawlina, W. (2016). *Histología: Texto y atlas*. Correlación con biología celular y molecular (Séptima Edición). Buenos Aires: Médica Panamericana.

SAGARPA. (2018). *Auto-declaración de México como país históricamente libre de la enfermedad hemorrágica del conejo*. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Self-declarations/ESP_Mexico_selfdec_EHC_Nov2018.pdf

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2010). Norma Oficial Mexicana nom-059-Semarnat-2010. Protección ambiental. *Especies nativas de México de flora y fauna silvestres. Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio. Lista de especies en riesgo*. Diario Oficial de la Federación, 6 de septiembre.

SENASICA. (2016). *Enfermedad Hemorrágica Viral de los conejos: 26 Aniversario del reto científico por la sanidad cunícola*. <https://www.gob.mx/senasica/articulos/enfermedad-hemorragica-viral-de-los-conejos-26-aniversario-del-reto-cientifico-por-la-sanidad-cunicola>

SENASICA. (2021). *Panorama Internacional de la Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos*. https://dj.senasica.gob.mx/Contenido/files/2021/mayo/PAIEHC21-05-21_f205c0da-1999-46fb-ab3b-ba1318e6c04c.pdf Revisado el 08/08/2022

SENASICA. (s.f). *Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos (EHVC)*. https://backend.aprende.sep.gob.mx/media/uploads/proedit/resources/enfermedad_hemorrag_1b06d566.pdf

SESC. (2010). *Lesiones blanquecinas multifocales en hígados de conejo*. Suport a Escorxadors. <https://sesc.cat/es/lesiones-blanquecinas-multifocales-en-higados-de-conejo/> Revisado el 04/08/2022

SISS. (2021). *Situación actual de la Enfermedad Hemorrágica del Conejo (VEHC2) en México y EUA*. Sistema de Inteligencia Sanitaria-SENASICA.

Smith, A. T., C. H. Johnston, P. C. Alves, y K. Häcklander. (2018). *Lagomorphs. Pikas, Rabbits and Hares of the World*. John Hopkins University Press. Baltimore, EE.UU. ISBN 9781421423418

Soto, M.M. A., Suami, H., & Chang, D. W. (2013). *Mapping superficial lymphatic territories in the rabbit*. *Anatomical record* (Hoboken, N.J. (2007), 296(6), 965–970. <https://doi.org/10.1002/ar.22699>

Spickler, A. R., & Roth, J. A. (2003). *Adjuvants in veterinary vaccines: modes of action and adverse effects*. *Journal of veterinary internal medicine*, 17(3), 273–281. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2003.tb02448.x>

Suckow, M.A & Schroeder, V. (2012). *The Laboratory Rabbit*. Segunda Edición. Taylor & Francis Group. ISB: 13: 978-1-4200-9106-9.

Suckow, M.A. & Schroeder, V. (2012). *The Laboratory rabbit*. Segunda Edición. Taylor & Francis Group. ISBN 978-1-4200-9106-9

The Center for Food Security & Public Health (CFSPH). (2010). *Enfermedad Hemorrágica del Conejo*.

https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/enfermedad_hemorragica_del_conejo.pdf

Revisado el 12/08/2022.

Varga, M. (2014). *Textbook of rabbit medicine*. Segunda Edición. Elsevier. ISBN 978-0-7020-4979-8

Velarde, R., Cavadini, P., Neimanis, A., Cabezón, O., Chiari, M., Gaffuri, A., Lavín, S., Grilli, G., Gavier-Widén, D., Lavazza, A., & Capucci, L. (2017). *Spillover Events of*

Infection of Brown Hares (Lepus europaeus) with Rabbit Haemorrhagic Disease Type 2 Virus (RHDV2) Caused Sporadic Cases of an European Brown Hare Syndrome-Like Disease in Italy and Spain. *Transboundary and emerging diseases*, 64(6), 1750–1761. <https://doi.org/10.1111/tbed.12562>

Wang, X., Xu, F., Liu, J., Gao, B., Liu, Y., Zhai, Y., Ma, J., Zhang, K., Baker, T. S., Schulten, K., Zheng, D., Pang, H., & Sun, F. (2013). *Atomic model of rabbit hemorrhagic disease virus by cryo-electron microscopy and crystallography.* *PLoS pathogens*, 9(1), e1003132. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003132>

Wu, L. (2022). *Rabbit meat trade of major countries: regional pattern and driving forces.* *World Rabbit Sci.*, 30: 69-82. <https://doi.org/10.4995/wrs.2022.13390>

Yang, D. K., Kim, H. H., Nah, J. J., & Song, J. Y. (2015). *Rabbit Hemorrhagic Disease Virus Variant Recombinant VP60 Protein Induces Protective Immunogenicity.* *Journal of microbiology and biotechnology*, 25(11), 1960–1965. <https://doi.org/10.4014/jmb.1504.04002>

Zhang, J., & Tao, A. (2015). *Antigenicity, Immunogenicity, Allergenicity.* *Allergy Bioinformatics*, 8, 175–186. https://doi.org/10.1007/978-94-017-7444-4_11

XIII. ANEXOS

Cuadro 6. Clasificación de las lesiones en el sitio de inoculación. Modificado y traducido de Leenaars, *et al.*, (1998).

Hallazgos patológicos en los sitios de inyección de conejos inyectados por vía subcutánea o intramuscular con diferentes combinaciones de adyuvante/antígeno; clasificación y calificación aplicadas ^a

Lesiones subcutáneas ^b

Grado 8	<ul style="list-style-type: none">• Lesiones exudativas extensas (generalmente acompañando a lesiones granulomatosas) con hemorragia severa, > 40 cm²• Lesiones similares a abscesos, diámetro > 2 cm• Úlcera > 1cm
Grado 6	<ul style="list-style-type: none">• Lesiones exudativas (generalmente acompañando a lesiones granulomatosas) con hemorragia < 20cm²• Lesiones granulomatosas nodulares extensas 20-100 cm²; necrosis central en granulomas; signos menores de inflamación aguda• Úlcera < 1 cm
Grado 4	<ul style="list-style-type: none">• Lesiones granulomatosas nodulares de 1-10 cm², sin necrosis central marcada ni hemorragia
Grado 2	<ul style="list-style-type: none">• Lesiones granulomatosas nodulares < 1 cm²• Mínima opacidad difusa (proliferación granulomatosa plana) y/o hiperemia mínima o local o sangrado petequial 5-25 cm²
Grado 0	<ul style="list-style-type: none">• Opacidad local negativa o mínima o hiperemia/petequias < 5 cm²

^a En algunos casos, las lesiones recibieron una puntuación intermedia

^b Cuando estaban presentes diferentes lesiones, se utilizó la puntuación más alta para clasificar el sitio de inyección