



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



**Evaluación de la seguridad de la vacuna Quivax 17.4 en bovinos
inmunizados y la producción de anticuerpos específicos en leche y sangre**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

Médico Veterinario Zootecnista

Presenta:

Edgar Hurtado Mendoza

Dirección:

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Codirección:

Dra. Lineth Juliana Vega Rojas

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Marzo de 2023



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales de
Información



Evaluación de la seguridad de la vacuna Quivax 17.4 en
bovinos inmunizados y la producción de anticuerpos
específicos en leche y sangre.

por

Edgar Hurtado Mendoza

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

Clave RI: CNLIN-265707-0223-323



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



Evaluación de la seguridad de la vacuna Quivax 17.4 en bovinos inmunizados y la producción de anticuerpos específicos en leche y sangre

TESIS

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

PRESENTA

Edgar Hurtado Mendoza

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Director

Dra. Lineth Juliana Vega Rojas

Codirectora

Dr. Alejandro Enríquez Vázquez

Sinodal

Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón

Sinodal

Dr. Rodrigo Jesús Barrón Rodríguez

Sinodal

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Marzo, 2023

RESUMEN.

El presente trabajo fue realizado bajo el marco de los ensayos preclínicos de la vacuna recombinante Quivax 17.4 contra el virus SARS-CoV-2, agente etiológico de la COVID-19. El objetivo de este trabajo fue evaluar la seguridad de la vacuna Quivax 17.4 en bovinos inmunizados y la producción de anticuerpos específicos en sangre y leche. Se utilizaron 12 bovinos, divididos en dos grupos; uno de tratamiento y uno de control, con 6 individuos cada uno. Los bovinos del grupo tratado recibieron dos dosis de 1 mL conteniendo proteína quimérica más adyuvante. El grupo control recibió solamente adyuvante. Las inmunizaciones se realizaron los días 0 y 21 utilizando concentraciones de 100 y 60 µg de la proteína respectivamente. Durante tres días posteriores a cada inoculación, fueron evaluadas las reacciones postvacunales de fiebre, inflamación local en el sitio de aplicación y el hemograma. Adicionalmente se colectaron muestras de leche y sangre para la obtención de suero. La evaluación del suero y leche también se llevó a cabo los días 10, 21, 31, 67 y 90 postvacunación. Ninguna de las vacas inmunizadas presentó reacciones secundarias adversas. No se detectó pirexia en ningún individuo durante la duración del experimento. Se presentaron reacciones locales leves en la mayoría de los individuos de ambos grupos caracterizadas por la presencia de masas firmes de tamaño variable en el sitio de inoculación, mismas que involucionaron hasta desaparecer hacia el día 60 postvacunación. No se presentaron alteraciones significativas en el hemograma vinculadas con la vacunación. Por medio de la técnica de ensayo de inmunoadsorción ligada a enzimas (ELISA) indirecto, fueron evaluados los anticuerpos IgG e IgA en suero y leche. La evaluación de anticuerpos confirmó la presencia de IgG en el suero de los animales inmunizados y los mayores títulos fueron alcanzados hacia el día 90 postinmunización. No se detectaron anticuerpos IgA en leche ni en suero en ninguno de los animales vacunados. Como conclusión de este trabajo, la vacuna recombinante Quivax 17.4 es segura debido a la ausencia de efectos secundarios adversos en los animales inmunizados, así mismo se comprobó la generación de anticuerpos IgG en sangre; sin embargo, la presencia de anticuerpos con isotipo IgA tanto en leche como en suero no pudo ser detectada.

Palabras clave: COVID-19, SARS-CoV-2, vacuna, anticuerpos, leche, ELISA indirecto.

SUMMARY.

The present work has been done under the context of preclinical trials of the Quivax 17.4 recombinant vaccine against SARS-CoV-2, causal agent of COVID-19. The aim of this work was to evaluate the security of Quivax 17.4 vaccine on immunized bovine and the production of specific antibodies on serum and milk. The population used were twelve Holstein-breed, dairy cows. The herd was divided aleatory in two groups, one of control and one of treatment, with six animals each one. A dose of 1 mL of chimeric protein plus adjuvant were inoculated to the treatment group. Control group received only a dose of adjuvant. Immunization took place on days 0 and 21, using a protein concentration of 100 µg on the first vaccination and 60 µg on the second one. Post-vaccine reactions were monitored including local inflammation signs, body temperature, hematic biometry, and the collection of blood and milk samples. Additional reaction monitoring took place on days 10, 21 31, 67 and 90. No animal showed a secondary adverse reaction or fever during the course of the evaluation. Mild local inflammation signs were presented in most individuals, characterized by the presence of firm masses, with fibrous touch and variable size on inoculation sites that progressively involute about day 60 post vaccination. There were no significant alterations on hematic biometry involved with vaccination. IgG and IgA antibodies detection in blood serum and milk was carried out by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and confirmed the presence of IgG class antibodies in serum of immunized animals. Higher titers of IgG class antibodies were found at day 90 postimmunization with an optic density of 0.47. No IgA antibodies were found on serum or milk of any vaccinated animal. As a conclusion of this work, the security of Quivax 17.4 and the generation of IgG antibodies has been proofed; perhaps, no IgA antibodies were detected on milk nor serum.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, vaccine, antibodies, milk, indirect ELISA.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito, por permitirme formar parte del equipo de trabajo del LINVAS. Por su paciencia y guía durante la realización de mi trabajo de titulación.

Al Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón por su constante e invaluable apoyo durante la licenciatura y por compartir conmigo su valioso conocimiento y experiencia.

A mis asesores de tesis, a la Dra. Lineth Juliana Vega Rojas, Dr. Alejandro Enriquez Vazquez y Dr. Jesús Rodrigo Barrón Rodríguez, por su tiempo, guía y apoyo durante la realización de la tesis, así como por compartir sus conocimientos conmigo.

A mis compañeros de laboratorio que amablemente me apoyaron durante la realización de los experimentos.

A la Dra. Claudia Berenice Robledo Monterrubio, por todo el apoyo brindado.

A las dos personas que más amo en la vida, mis padres: María Luisa Mendoza Correa y Alfonso Miguel Ángel Hurtado Piñón. Gracias por todo.

A Diana Elizabeth Domínguez Ledezma, gracias por tu paciencia, tiempo, apoyo y cariño, sin ti todo se hubiera complicado demasiado.

A mis hermanos, Sergio Herrera Paz y Antonio Domingo Escobedo Ramírez, gracias por su apoyo incondicional y por ser un pilar esencial en tiempos difíciles.

Índice de contenido

Resumen	I
Summary	II
Agradecimientos	III
Índice de contenido	IV
Índice de cuadros	VI
Índice de figuras	VII
I. INTRODUCCIÓN.	11
II. ANTECEDENTES	12
2.1 Coronavirus	12
2.2 Especies de interés veterinario afectadas por virus de la familia <i>Coronaviridae</i>	14
2.3. Coronavirus humanos	15
2.3.1 SARS-CoV-2	17
2.4. Componentes del virus SARS-CoV-2	20
2.5. Mecanismo de infección.	26
2.6. Variantes	28
2.7. COVID-19	31
2.7.1 Transmisión.	31
2.7.2 Signos, síntomas y diagnóstico.	32
2.8. Epidemiología y control	33
2.9. Respuesta inmune contra SARS-CoV-2.	34
2.10. Infecciones por SARS-CoV-2 en otras especies	36
2.11. Vacunas contra SARS-CoV-2	38
III. HIPÓTESIS	42
IV.OBJETIVOS	42
V. MATERIALES Y MÉTODOS	43
5.1 Obtención del antígeno.	43
5.2 Preparación de vacuna, inmunización	44
5.3 Monitoreo clínico de los animales.	45
5.4 Colecta de muestras de sangre, leche y traslado al laboratorio	46
5.5 Método de Bradford para cuantificación proteica.	46
5.6 Determinación de anticuerpos mediante ELISA indirecta	46
5.7 Análisis estadístico	48

VI. RESULTADOS	48
6.1 Evaluación de la seguridad.	48
6.2 Hemogramas.	56
6.2.1 Eritrograma preinmunización.	56
6.2.2 Eritrograma post inmunización.	57
6.2.3 Leucograma preinmunización.	57
6.2.4 Leucograma post inmunización.	59
6.3 Sensibilización de placas	60
VII. DISCUSIÓN.	67
VIII. CONCLUSIONES.	72
IX. REFERENCIAS	73

ÍNDICE DE CUADROS.

Cuadro 1. Taxonomía de SARS-CoV-2.	13
Cuadro 2. Coronavirus de interés veterinario.	14
Cuadro 3. Coronavirus que afectan al ser humano.	15
Cuadro 4. Principales funciones de las proteínas no estructurales de SARS-CoV-2.	22
Cuadro 5. Variantes de interés (VOI) de SARS-CoV-2.	30
Cuadro 6. Vacunas contra SARS-CoV-2 aprobadas por OMS y COFEPRIS para su uso de emergencia.	41
Cuadro 7. Monitoreo clínico (Día cero). Temperatura corporal y reacción inflamatoria localizada.	49
Cuadro 8. Monitoreo clínico (Día 1 postinmunización). Temperatura corporal y reacción inflamatoria localizada.	49
Cuadro 9. Monitoreo clínico (Día 2 postinmunización). Temperatura corporal y reacción inflamatoria localizada.	50
Cuadro 10. Monitoreo clínico (Día 10 postinmunización). Temperatura corporal y reacción inflamatoria localizada.	50
Cuadro 11. Administración de segunda dosis vacunal y monitoreo clínico (Día 21). Temperatura corporal y reacción inflamatoria localizada.	51
Cuadro 12. Monitoreo clínico (Día 22 postinmunización). Temperatura corporal y reacción inflamatoria localizada.	52
Cuadro 13. Monitoreo clínico (Día 23 postinmunización) Temperatura corporal y reacción inflamatoria localizada.	52
Cuadro 14. Monitoreo clínico (Día 31 postinmunización). Temperatura corporal y reacción inflamatoria localizada.	53
Cuadro 15. Monitoreo clínico (Día 60 postinmunización). Temperatura corporal y reacción inflamatoria localizada.	54
Cuadro 16. Monitoreo clínico (Día 90 postinmunización). Temperatura corporal y reacción inflamatoria localizada.	55
Cuadro 17. Eritrograma practicado a los bovinos de los grupos control y tratamiento, previos a la exposición con el antígeno vacunal.	56
Cuadro 18. Eritrograma practicado a los bovinos de los grupos control y tratamiento, posterior a la exposición con el antígeno vacunal.	57
Cuadro 19. Leucograma practicado a los bovinos de los grupos control y tratamiento, previos a la exposición con el antígeno vacunal.	58
Cuadro 20. Leucograma practicado a los bovinos de los grupos control y tratamiento, posteriores a la exposición con el antígeno vacunal.	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del virión de SARS-CoV-2.	19
Figura 2. Localización de proteínas estructurales y no estructurales (NSP) en el genoma de SARS-CoV-2.	20
Figura 3. Estructura de la subunidad S1, dominio de unión a receptor (azul) y motivo de unión a receptor o RBM (rojo) unida a su receptor ACE-2 (verde).	24
Figura 4. Estructura de las subunidades S1 y S2 de la proteína S.	25
Figura 5. Esquema de la infección y ciclo replicativo de SARS-CoV-2.	27
Figura 6. Factores implicados en el surgimiento de nuevas variantes	29
Figura 7. Esquema de la inmunorreacción inducida por medio de vacunas basadas en proteínas recombinantes.	41
Figura 8. Fotografía a 100x de las micelas menores a 5µm resultantes de la emulsificación de la proteína recombinante con el adyuvante oleoso.	45
Figura 9. Esquema de inmunización y monitoreo clínico de bovinos.	48
Figura 10. Gráfica de evaluación de la concentración de antígeno ideal para forrar las placas de ELISA.	60
Figura 11. Determinación de los títulos de anticuerpos IgG.	62
Figura 12. Gráfica de la evaluación de la respuesta de anticuerpos IgG totales presentes en suero.	63
Figura 13. Gráfica de la evaluación de la respuesta de anticuerpos totales IgA presentes en suero con dilución 1:400.	64
Figura 14. Gráfica de la evaluación de la respuesta de anticuerpos totales IgG en leche.	65
Figura 15. Gráfica de la evaluación de la respuesta de anticuerpos IgA en leche dilución 1:400.	65

I. INTRODUCCIÓN.

El brote inicial de la enfermedad denominada por la OMS como COVID-19 causada por el *Coronavirus* emergente, SARS-CoV-2 originado en la ciudad de Wuhan, China, concretamente en la provincia de Hubei, se convirtió en la antesala de una crisis global sin precedentes. La acelerada transmisión del virus hacia la mayoría de los países del mundo, su letalidad y elevada infecciosidad tuvieron como consecuencia que la Organización Mundial de la Salud declarara la situación como emergencia de carácter internacional el 30 de enero del año 2020, un mes posterior al primer caso reportado el 31 de diciembre de 2019. Eventualmente, el 11 de marzo sería declarada oficialmente pandemia. A la fecha, se ha vuelto una enfermedad prevalente en la mayoría de las regiones del orbe (Centeno-Tablante *et al*, 2020; Zhou *et al*, 2021).

Según la Organización Mundial de la Salud, se estima que en el mundo existen aproximadamente 637 millones de personas contagiadas con SARS-CoV-2, y 6.6 millones de defunciones a causa de las complicaciones de infección en cuestión por este virus (WHO, 2022). En México los datos de CONACYT revelan que, hasta el inicio del mes de diciembre de 2022 un estimado de 7,443,315 millones de personas han sido infectadas a lo largo de la pandemia, así como la cantidad de 344,478 personas que han fallecido a causa de COVID-19 (CONACYT, 2022).

Actualmente en el mundo existen 11 vacunas aprobadas por la OMS para uso de emergencia. Por su parte, México cuenta con 9 vacunas aprobadas. Estas se basan en diferentes plataformas vacunales como es el uso de moléculas de RNAm, vectores virales, el uso del virión inactivado, y el empleo de subunidades proteicas inmunogénicas concretamente de la proteína S y sus fracciones S1 y S2, así como epítomos del dominio de unión a receptor (RBD) (Mistry *et al*, 2022).

El presente trabajo se llevó a cabo utilizando una quimera multipeptídica recombinante con epítomos presentes en el RBD de SARS-CoV-2, que fue sintetizada y purificada a partir de un cultivo de *Escherichia coli* BL-21-A1 en la que fue insertado un plásmido con el gen que codifica a la quimera multipeptídica.

A la fecha del inicio del experimento, no existían reportes sobre estudios en los que se demostrara que los anticuerpos producidos en ganado lechero contra SARS-CoV-2 podían ser secretados en la leche. Por lo tanto, el análisis del comportamiento de la quimera multipeptídica fue llevado a cabo en modelos de la especie *Bos taurus* de la raza Holstein, empleados como ganado productor lácteo en la unidad lechera de la Universidad Autónoma de Querétaro, utilizando un esquema de dos inmunizaciones realizando la primovacunación en el día 0 y posteriormente una segunda dosis al día 21.

El objetivo planteado para esta tesis fue la evaluación de la seguridad de la vacuna quimérica desarrollada por la UAQ y la evaluación de la producción de anticuerpos en suero y leche

empleando la técnica de ELISA indirecta. La seguridad se evaluó monitoreando el estado de los animales en los días posteriores a la inoculación para descartar alguna reacción secundaria adversa, realizando revisiones para monitorear la temperatura corporal y posibles lesiones en el sitio de aplicación; además de la realización de hemograma para monitorear los valores hematológicos presentados pre y postinmunización.

II. ANTECEDENTES

2.1 Coronavirus

Los virus que se agrupan dentro de la familia *Coronaviridae* son partículas envueltas con morfología esférica, estas poseen un tamaño aproximado de 120 a 160 nm (ICTV, 2023). Contienen un genoma que oscila entre las 26 a 32 kb, tratándose del material genético viral constituido por RNA con mayor tamaño conocido actualmente (Yang *et al*, 2020; Zhou *et al*, 2021). El origen de su nombre posee su raíz etimológica en el latín *Corona* cuya traducción al castellano tiene idéntico significado, y fue acuñado en 1967 por June Almeida, quien en conjunto con David Tyrrel fueron pioneros en la obtención de imágenes de partículas virales mediante el uso de microscopía electrónica. El nombre hace referencia a la morfología del virión apreciada en las micrografías con sus trímeros proteicos denominados proteína S, protruyendo a partir de la membrana, hacia el exterior de la partícula viral que recuerdan la imagen de la corona solar (Henry, 2020).

Son pertenecientes al orden *Nidovirales* que forma parte del grupo IV de la clasificación de Baltimore y toma su nombre del latín *nido*, haciendo referencia a la transcripción de diversos RNA subgenómicos “anidados” en el extremo 3' del genoma (Zhou *et al*, 2021). Se trata de partículas virales que poseen genomas grandes no segmentados, constituidos por RNA monocatenario con sentido positivo, (Fher & Pearlman, 2015). A la fecha, se reconocen 8 subórdenes pertenecientes al orden *Nidovirales*: *Abnidovirineae*, *Arnidovirineae*, *Mesnidovirineae*, *Monidovirineae*, *Nanidovirineae*, *Ronidovirineae*, *Tornidovirineae* y *Cornidovirineae*, éste último alberga una única familia, la familia *Coronaviridae* misma que es considerada como la más extensa del orden. A su vez contiene tres subfamilias *Lethovirinae* con una sola especie denominada *Microhyla letovirus I* (MLeV) aislado de la rana *Microhyla fissipes*; *Pitovirinae* también con una sola especie que afecta peces del género *Oncorhynchus* (Mordecai *et al*, 2019; Scoch *et al*, 2020) y *Orthocoronavirinae* donde encontramos una extensa variedad de virus que pueden ser causantes de enfermedad respiratoria, gastroentérica o nerviosa (Yang *et al*, 2020) en aves y mamíferos incluyendo a la especie *Homo sapiens* (Zhou *et al*, 2021).

Por otra parte la subfamilia *Orthocoronavirinae* ha sido dividida en cuatro géneros inicialmente agrupados por sus características serológicas; sin embargo, en la actualidad su

clasificación se basa en criterios filogenéticos (Fher & Pearlman, 2015), estos son denominados: *Alphacoronavirus* (Alpha-CoV), género más diverso, donde se encuentran varios virus de importancia veterinaria que afectan animales de producción y compañía; *Betacoronavirus* (Beta-CoV) dentro del cual se encuentran virus de elevada capacidad patogénica y de gran importancia epidemiológica y epizootica. Ambos géneros poseen la capacidad de infectar células de mamíferos y su mayor reservorio en la naturaleza se encuentra en miembros del orden *Chiroptera*. Los dos géneros restantes, *Gammacoronavirus* (Gamma-CoV) y *Deltacoronavirus* (Delta-CoV) son responsables de infectar principalmente organismos aviares, y algunos mamíferos como cetáceos, félidos, mustélidos y suidos (**Cuadro 1**) (Zhou *et al*, 2021).

Cuadro 1. Taxonomía de SARS-CoV-2 (Gorbalenya *et al.*, 2020).

Orden	<i>Nidovirales</i>
Suborden	<i>Cornidovirineae</i>
Familia	<i>Coronaviridae</i>
Subfamilia	<i>Orthocoronavirinae</i>
Género	<i>Betacoronavirus</i>
Subgénero	<i>Sarbecovirus</i>
Especie	<i>Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus</i>
Individuum	SARS-CoV-2

Los virus pertenecientes a la familia *Coronaviridae* han sido objeto de especial atención para la virología y la inmunología veterinaria debido a su capacidad para infectar una variedad de especies y provocar diversas enfermedades de índole respiratorio, gastroentérico, renal, hepático y nervioso en animales silvestres y domésticos, tanto de compañía como con finalidad productiva (Fher & Pearlman, 2015; Wang & Yoo, 2022). Es importante señalar que actividades como la urbanización, el cambio del uso de suelo para la agricultura, la ganadería y la urbanización, así como el tráfico de fauna silvestre son factores que favorecen

el surgimiento de nuevos coronavirus, y aumentan la probabilidad de recombinar sus genomas entre si, al mantener diversas especies animales en contacto estrecho (Fher & Pearlman, 2015; Focosi & Maggi, 2022; Poudel et al, 2020).

2.2 Especies de interés veterinario afectadas por virus de la familia *Coronaviridae*

Los coronavirus han sido reconocidos en la virología veterinaria durante varias décadas. Estos afectan a un amplio rango de animales domésticos y silvestres que significan un potencial peligro para la salud pública y veterinaria. Estos virus son responsables de cuadros respiratorios, entéricos, hepáticos y neurológicos; y son altamente adaptables y debido a su capacidad de recombinación existe la posibilidad de extender su rango de tropismo u hospedador (Fher & Pearlman, 2015).

Género	Especies Susceptible	Agente	Tropismo
<i>Alphacoronavirus</i>	Suidos domésticos y silvestres	<ul style="list-style-type: none"> TGEV PEDV <u>SADCoV</u> 	Digestivo
	Cánidos	<ul style="list-style-type: none"> CCoV 	Digestivo
	Félidos	<ul style="list-style-type: none"> <u>FECoV/</u> FIPV 	Digestivo Nervioso Fagocítico-mononuclear
<i>Betacoronavirus</i>	Suidos	<ul style="list-style-type: none"> PHEV 	Digestivo Nervioso
	Cánidos	<ul style="list-style-type: none"> <u>CRCoV</u> 	Respiratorio
	Équidos	<ul style="list-style-type: none"> <u>ECoV</u> 	Nervioso
	Rumiantes domésticos y silvestres	<ul style="list-style-type: none"> <u>BCoV</u> 	Respiratorio Digestivo
	Roedores	<ul style="list-style-type: none"> MHV 	Nervioso Hepático
<i>Gammacoronavirus</i>	Aves	<ul style="list-style-type: none"> IBV 	Respiratorio Genitourinario
		<ul style="list-style-type: none"> TCoV 	
<i>Deltacoronavirus</i>	Suidos	<ul style="list-style-type: none"> <u>PDCoV</u> 	Gastroentérico

Cuadro 2. Coronavirus de interés veterinario

2.3. Coronavirus humanos

Los Coronavirus patógenos que han sido aislados de seres humanos (HCoV), son pertenecientes a los géneros Alpha-CoV y Beta-CoV, siendo estos últimos los que presentan mayor grado de infecciosidad, patogenicidad y letalidad, convirtiéndose en un foco de atención para la salud pública. En general los coronavirus humanos son responsables de infecciones en el tracto respiratorio, y algunos de ellos poseen la capacidad de infectar otros tipos celulares, como células del sistema nervioso y digestivo, además de células hepáticas y renales. Algunos de estos agentes han sido asociados con la exacerbación de síntomas de enfermedades crónicas como el asma y como agentes causales de síndromes neurológicos crónicos como el de Kawasaki, así como esclerosis múltiple (Liu et al, 2021).

A la fecha se han aislado 7 virus patógenos en humanos pertenecientes a los géneros *Alphacoronavirus* y *Betacoronavirus* (Hartenian et al, 2020), además de los casos recientes de infantes haitianos afectados por PDCoV (Lednicky et al, 2021).

Cuadro 3. Coronavirus que afectan al ser humano.

Género	Agente	Descripción
--------	--------	-------------

<i>Alphacoronavirus</i>	HCoV-229E	Aislado por primera vez en la década de 1960, causa rinorrea, rinitis, cefalea y malestar general. Quirópteros fungen como reservorios y camélidos como hospedadores intermediarios. Asociado como agente etiológico o predisponente para el síndrome de Kawasaki (Liu et al, 2021; Fher & Pearlman, 2016; Su et al, 2016).
	HCoV-NL63	Aislado en 2004, es responsable de fiebre, tos, dolor de garganta, bronquitis y neumonía. Los Quirópteros fungen como reservorios. Asociado con la presentación del síndrome de Kawasaki (Poudel et al, 2020; Abdul-Rasool et al, 2010; Weng et al, 2019; Pyrc et al, 2006).
<i>Betacoronavirus</i>	HCoV-OC43	Aislado por primera vez en 1967. Provoca rinorrea, rinitis, cefalea y se ha demostrado su capacidad neurotrópica. Los roedores fungen como reservorios (Liu et al, 2021; Poudel et al, 2020; Liu et al, 2021).
	HCoV-HKU1	Aislado en 2004. Causa fiebre, dolor de garganta, tos, rinorrea. Se ha asociado a cuadros hepáticos y gastroentéricos. Los roedores fungen como reservorios (Woo et al, 2004; Woo et al, 2009; Poudel et al; 2020).
	MERS-CoV	Aislado por primera vez en 2012, causante de brote epidémico. Es el agente etiológico del síndrome respiratorio de medio oriente, que cursa con: fiebre, malestar general, mialgia, cefalea, tos, dolor de garganta, disnea, diarrea, vómito, cuadros neurológicos, vasculares y coagulopatías; shock séptico y ARDS. Los quirópteros fungen como reservorio y camélidos como hospedadores intermediarios (Chafekar & Fielding, 2018; Poudel et al, 2020; Raaban et al, 2020).
	SARS-CoV	Aislado por primera vez en 2002, es responsable de brote epidémico. Es agente causal del síndrome agudo respiratorio severo, que se caracteriza por la presencia de fiebre, tos, mialgia, cefaleas, diarrea, disnea y neumonía. Quirópteros fungen como reservorio y algunos prociénidos, vivérridos y mustélidos como hospedadores intermediarios (Raaban et al, 2020; Poudel et al, 2020).

	SARS-CoV-2	Aislado por primera vez en 2019. Causante de brote pandémico. Es agente etiológico de la COVID-19 que cursa con fiebre, tos, fatiga, mialgia, cefalea, artralgia, dolor de garganta, disnea y ARDS; así como cuadros nerviosos, gastroentéricos y vasculares. Los Quirópteros fungen como reservorio y aún no se conoce con certeza al hospedador intermediario (Ke et al, 2020; Delaune et al, 2021; Xiao et al, 2020; Wang et al, 2020; WHO, 2021).
--	------------	---

2.3.1 SARS-CoV-2

Es la denominación asignada por el ICTV (International Committee of Taxonomy of Virus) al agente viral inicialmente denominado 2019-nCoV, causante de la pandemia de COVID-19 (Coronavirus Disease 19) que comenzó en diciembre del año 2019, en la ciudad China de Wuhan como un brote de enfermedad respiratoria aguda severa (Ke et al, 2020).

Los orígenes del SARS-CoV-2 aún permanecen sin ser completamente esclarecidos; sin embargo, se sabe que posee una alta relación genómica con algunos virus aislados años atrás en quirópteros del género *Rhinolophus*, presentes en varias provincias en China. Se deduce que la presencia de virus similares al SARS-CoV-2 poseen un amplio rango de distribución geográfica, más allá del epicentro de la pandemia (Delaune et al, 2020).

El coronavirus que presenta mayor relación filogenética con SARS-CoV-2 es el RaTG13-CoV, aislado de ejemplares de la especie *Rhinolophus affinis* en Yunnan, China durante 2013 con el cual comparte 96% en la homología de sus secuencias, por lo que se hipotetiza que este también tiene su reservorio natural en quirópteros y que posiblemente algún animal silvestre en contacto continuo con la población humana fungió como hospedador intermediario o amplificador del agente, propiciando su diseminación zoonótica (Bakhiet & Taurin, 2021; Delaune et al, 2021). Dicho agente posee un 100% de homología en las secuencias de aminoácidos de la proteína E, 98.6% en M, 97.8% en N y 90.7% en su proteína S; en la que particularmente su RBD es casi idéntico al de SARS-CoV-2 difiriendo únicamente en un aminoácido (Xiao et al, 2020). Adicionalmente, se han realizado pruebas serológicas en las que anticuerpos antiSARS-CoV-2 producen una fuerte reacción cruzada contra RaTG13 (Liu et al, 2021).

Es importante señalar que SARS-CoV-2 posee un porcentaje de homología de su genoma de 40 a 50% con MERS-CoV y 79.6% con relación a SARS-CoV, además con este último comparte las 4 proteínas estructurales y la codificación de 16 NSPs mediante el ORF1ab (Yang et al, 2020; Bakhiet & Taurin, 2021). A pesar de las similitudes presentes entre las secuencias de aminoácidos y las estructuras proteicas de los *Sarbecovirus*, SARS-CoV y

SARS-CoV 2, se ha observado una homología escasa, de aproximadamente un 40% en las secuencias de aminoácidos del subdominio externo conocido como dominio de unión a receptor, o *receptor binding domain* (RBD), así como un 76.5% en lo que respecta a la estructura de la proteína S, además de algunas NSP como lo son: ORF8, ORF3b y ORF10 (Arya et al, 2021; Yang et al, 2020).

El virión posee morfología esférica, con un diámetro aproximado de 91-100 nm sin contar las espículas de la proteína S, mismas que miden un promedio de 23 nm (Laue et al, 2021). Consta, en el exterior de una bicapa lipídica obtenida mediante la exocitosis realizada a partir de la célula previamente infectada, en la que este fue ensamblado. Presenta 4 proteínas por medio de las cuales se encuentra conformado estructuralmente el virión: S, M, E, y N. El virión posee la presencia de ciertos relieves presentes en la membrana que corresponden a la proteína N, además de presentar la protrusión de trímeros glicoproteicos que conforman a la proteína S, misma que le confiere al virión su forma característica de “corona solar” al ser observado por medio de microscopía electrónica, esta posee la capacidad de unión al receptor de la enzima convertidora de angiotensina (ACE-2) y tiene como función esencial la unión virus-célula y mediar la internalización del material vírico al interior de la célula diana (**Figura 2**) (Ke et al, 2020).

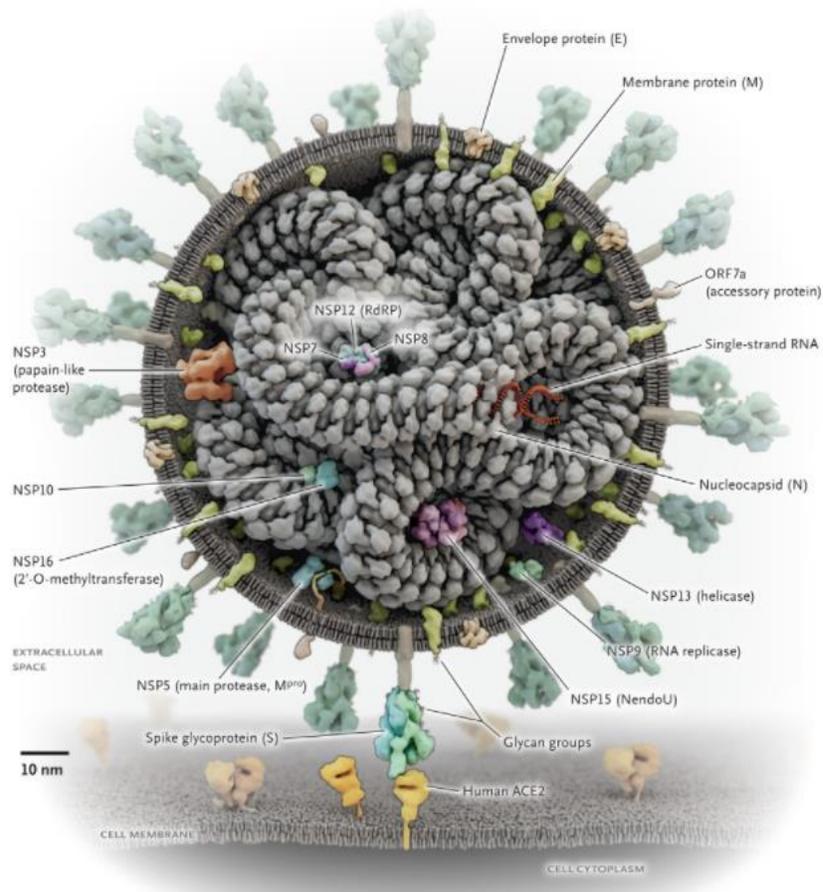


Figura 1. Estructura del virión de SARS-CoV-2 (tomado de Parks & Smith , 2020).

El material genético del virus en cuestión consta de RNA monocatenario con sentido positivo, con aproximadamente 29 kb y es capaz de codificar 27 proteínas (Bakhiet & Taurin, 2021). El RNA genómico (gRNA) que posee el virus SARS-CoV-2 consta de 14 marcos abiertos de lectura u *open reading frames* (ORF), dos ORFs principales comprenden 2 tercios del genoma y son denominados ORF1a y ORF1b mismos que se superponen entre sí provocando durante la traducción, el fenómeno conocido como desplazamiento de marco ribosomal (-1) o *Ribosomal Frameshifting* (-1) (Arya *et al*, 2021). Como consecuencia de la escisión de ORF1a y ORF1b se traducen dos poliproteínas (PP1a y PP1ab) que pueden ser expresadas usando directamente como molde la cadena de RNA+ (Hillen *et al*, 2021) posteriormente serán procesadas por medio de las proteasas virales denominadas Main-protease (Mpro) y Papain-like protease (PLpro) para llevar a cabo la producción de las NSPs 1 a 16. En el tercio restante del genoma se encuentran ORFs superpuestos que son codificantes para las 4 proteínas estructurales características de la familia: S, M, E y N,

además de otras proteínas accesorias denominadas ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF9 y ORF10 (**Figura 1**) (Arya et al, 2021).

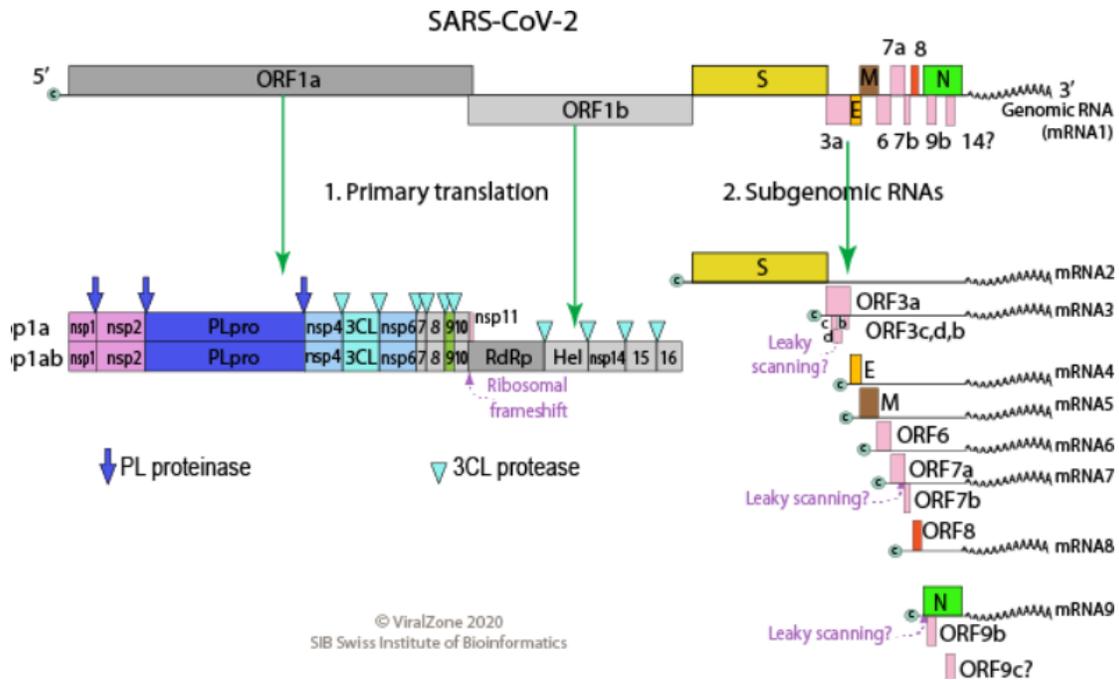


Figura 2. Localización de proteínas estructurales y no estructurales (NSP) en el genoma de SARS-CoV-2 (tomado de ViralZone, 2020).

2.4. Componentes del virus SARS-CoV-2

Como se ha mencionado anteriormente, el virión de SARS-CoV-2 se encuentra conformado por 4 proteínas de carácter estructural y 11 proteínas accesorias con diversas funciones (**Cuadro 2**), entre las que destacan la inducción de apoptosis, antagonismo de IFN-1, supresión de la respuesta antiviral por parte de la célula, activación de inflamomas y generación de “tormenta de citocinas” (Arya et al, 2021; Redondo et al, 2021).

A continuación, se realiza una breve descripción de la función de las proteínas estructurales y NSPs codificadas por SARS-CoV-2:

- **Proteína E.**

Se trata de la proteína estructural más pequeña presente en el virión, conformada por 75 aminoácidos. Comprende tres dominios, un dominio N- terminal hidrófilo, un dominio transmembranal hidrofóbico (TMD) y un dominio C-terminal hidrófilo. Juega un papel

importante en el ensamblaje del virión, se especula su rol en el proceso de diseminación de las partículas virales, cambios de potencial de membrana y la capacidad de activar el inflammasoma del hospedador, por lo que se deduce que podría estar involucrada en la inducción de tormenta de citocinas. A su vez, su interacción con la proteína M promueve la flexibilidad de la membrana, curvándola y dando forma a la partícula viral (Decaro et al, 2020; Hartenian et al, 2020; Arya et al, 2021; Cao et al, 2021).

- **Proteína M.**

Es la proteína estructural más abundante en el virión y es responsable de originar la forma y los límites de la envoltura viral. Se trata de una glicoproteína que está conformada por 222 aminoácidos, se divide en un ectodominio amino-terminal, un dominio transmembranal de estructura triple helicoidal y un dominio interno largo carboxi-terminal (Decaro et al, 2020; Cao et al, 2021). Se conoce su papel importante en la incorporación de componentes esenciales para el nuevo virión durante la morfogénesis viral y al unirse con la proteína N realizan el empaquetamiento del genoma en nuevas partículas virales (Hartenian et al, 2020). Su interacción con el resto de proteínas estructurales causa la estabilización de la conformación del virión (Cao et al, 2021).

- **Proteína N.**

Se trata de una fosfoproteína compuesta por un NTD y CTD con capacidad de unión a RNA (Dinesh et al, 2020). Tiene como funciones la modulación de la replicación y síntesis de RNA viral mediante interacciones con Nsp3 (Decaro et al, 2020; Arya et al, 2021). También es capaz de unir el RNA genómico con la membrana e interviene en el empaquetamiento de este en una ribonucleo-cápside helicoidal para su posterior ensamblaje en el interior del virión (Dinesh et al, 2020; Arya et al, 2021). La proteína de nucleocápside, suele producirse en grandes cantidades durante una infección, una consideración importante sobre la proteína N es que posee alta capacidad inmunogénica, por lo que eventualmente debería tomarse en cuenta como objetivo para la producción de vacunas anti SARS-CoV-2 (Arya et al, 2021).

- **Proteína S y su receptor ACE-2**

Se trata de una proteína de fusión de Clase I, que es característica de los virus envueltos. Posee en común una estructura trimérica, altamente glicosilada con el péptido de fusión oculto hasta que un desencadenante como puede ser la unión a receptor o un descenso del pH, permite la fusión de membranas y permite la internalización del material viral la célula huésped (White *et al*, 2008).

Cuadro 4. Principales funciones de las proteínas no estructurales de SARS-CoV-2.

Proteína	Función
Nsp1	Interfiere con la síntesis proteica del hospedador, para entorpecer la respuesta inmune innata. Supresión de apoptosis (Raj, 2020; Arya et al, 2021).
Nsp2	Interviene en la interrupción de las señalizaciones intracelulares (Raj, 2020).
Nsp3 (PLp)	Enzima requerida para el procesamiento de las poliproteínas virales para generar un complejo replicativo funcional y permitir la dispersión viral. Realiza modificaciones enzimáticas postraduccionales en proteínas del hospedador (Shin et al, 2020; Arya et al, 2021).
Nsp4	Interviene en la replicación y el ensamblaje de estructuras replicativas (Raj, 2020).
Nsp5 (Mpro)	Actividad enzimática implicada en la escisión de las poliproteínas virales Pp1a y Pp1ab para la generación de 12 proteínas funcionales (Arya et al, 2021).
Nsp6	Genera autofagosomas a partir del retículo endoplásmico e interviene en la autofagia (Raj, 2020).
Nsp7/Nsp8/Nsp12 (RdRp/NiRAN)	La RNA polimerasa dependiente RNA(Nsp12) en conjunto con Nsp7 y Nsp8 forman el complejo de replicación-transcripción necesario para la síntesis, encasquetamiento y prueba de lectura del genoma de RNA. Esencial para la incorporación y polimerización de nucleótidos de RNA (actividad nucleotidiltransferasa) (Arya et al, 2021; Hillen, 2021).
Nsp9	Interactúa con Nsp8 para la replicación y virulencia (Raj, 2020; Arya et al, 2021).
Nsp10	Interactúa con Nsp14 y Nsp16 para formar el complejo de metilación del RNA (Raj, 2020; Arya et al, 2021).
Nsp11	Posé actividad en la replicación del material genético (Raj, 2020).
Nsp13	Actividad RNA ATPasa y helicasa (Raj, 2020).

Nsp14	Actividad exorribonucleasa, metiltransferasa y de prueba de lectura. Se asocia a la evolución y mantenimiento del gran genoma de RNA de la familia <i>Coronaviridae</i> (Raj, 2020; Arya et al, 2021).
Nsp15	Actividad de endorribonucleasa, implicada en la evasión de los mecanismos de defensa celulares para la detección de RNA viral (Raj, 2020; Arya et al, 2021).
Nsp16	Actividad metiltransferasa para el encasquetamiento del RNA (Arya et al, 2021).

Siguiendo el modelo típico de las proteínas de fusión de clase I, la proteína S madura protruye a partir de la membrana viral. Consta de 1273 aminoácidos, y posee una estructura homotrimérica, conformada por dos subunidades denominadas S1 y S2. La S1 se conforma por un dominio N-terminal (S-NTD) cuya función se ha propuesto como estabilizador de S2 durante su conformación de postfusión; y la presencia del dominio de unión a receptor o RBD (Wang et al, 2020; Arya et al, 2021; Jackson et al, 2022; Mistry et al, 2022) mismo que a su vez se encuentra conformado por dos dominios principales, el núcleo y las subunidades externas. Está formado por una estructura de 5 hebras retorcidas con estructura β -laminar antiparalela, denominadas $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$ y $\beta 7$, con hélices y bucles de conexión corta que conforman el núcleo, a partir de este, entre las láminas $\beta 4$ y $\beta 7$, se forma una extensión denominada motivo de unión a receptor o RBM formado por bucles y α -hélices además por parte de las cadenas cortas $\beta 5$ y $\beta 6$, este posee la mayor cantidad de sitios de unión a la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE₂), formando una estructura en forma de “cuna” para la aproximación con esta (**Figura 3**) (Lan et al, 2020; Wang et al, 2020; Arya et al, 2021; Jackson et al, 2022).

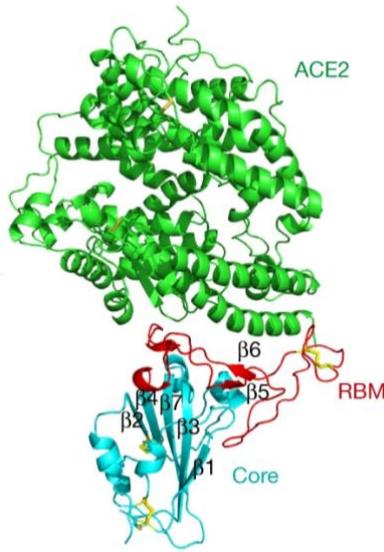


Figura 3. Estructura de la subunidad S1, dominio de unión a receptor (azul) y motivo de unión a receptor o RBM (rojo) unida a su receptor ACE-2 (verde) (Lan et al 2020).

Durante la conformación de prefusión, el dominio HR1 forma 4 hélices para fungir como el soporte principal de S2. Una vez que S1 ha hecho contacto y se ha unido a su receptor, se llevan a cabo cambios estructurales que desembocan en el estado de postfusión en el que ambas subunidades son disociadas por medio de la acción proteolítica de las proteasas del hospedador denominadas TMPRSS2 y catepsinas. Posteriormente, el complejo de tres pares de HR1 y HR2 forman la estructura denominada haz de 6 hélices o 6HB de la cual emerge FP la cual sufre otro proceso proteolítico. Esta serie de cambios provocan que ambas membranas se fusionen dando paso a la internalización del material genético viral (Arya et al, 2021). La función principal de la subunidad S2 es, por tanto, el anclaje y fusión de la membrana viral con la membrana de la célula blanco (Wang et al, 2020).

El RBD por su parte, es capaz de adoptar dos conformaciones distintas, estas se denominan como estado abierto y cerrado. El primero favorece la unión a ACE₂ debido a la exposición del RBD con su conformación “hacia arriba” y promueve el inicio del proceso de fusión de membranas. Por su parte el estado cerrado podría tener función de enmascaramiento o evasión del sistema inmunitario (Wang et al 2020).

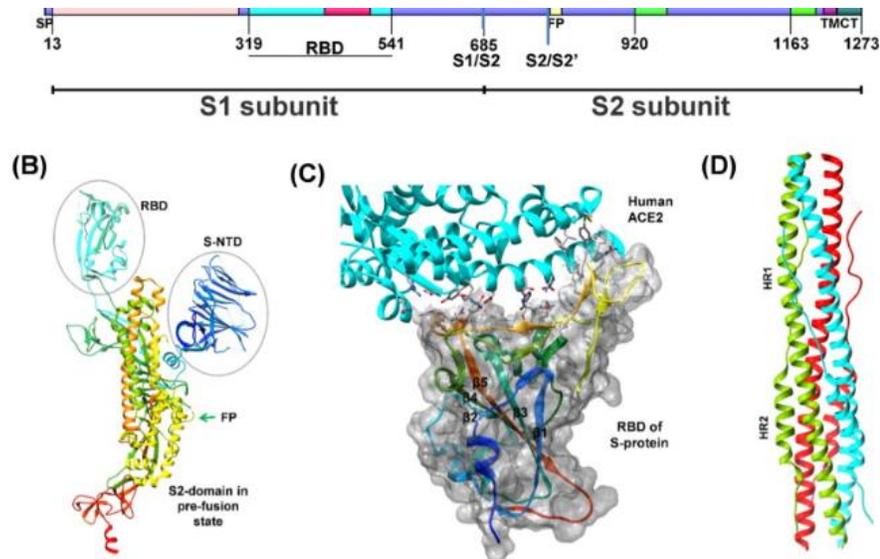


Figura 4. Estructura de las subunidades S1 y S2 de la proteína S (tomado de Arya et al, 2021).

La proteína S de SARS-CoV-2 reconoce como receptor a la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE₂), (Arya et al, 2021). ACE₂, es una peptidasa transmembranal que puede encontrarse activa tanto unida a la membrana, como en forma soluble. Juega un papel importante en el eje renina-angiotensina-aldoesterona en el que se ven inmiscuidos la regulación de la presión sanguínea, el balance electrolítico y la resistencia vascular (Sajdel-Sulkowska, 2021). Se encuentra constituida por 805 aminoácidos y posee 4 dominios: un péptido de señal en el extremo N-terminal, un sitio activo con actividad metaloproteasa, un dominio transmembranal y un dominio citoplasmático en el extremo C-terminal (Yalcin et al. 2021). Concretamente, se encarga de la hidrólisis de la angiotensina II regulando su rol como vasoconstrictora, degradándola en angiotensina III con papel vasoconstrictor poco eficaz, angiotensina IV y angiotensina 1-7 que presentan actividad opuesta a la angiotensina II funcionando como vasodilatadores; y angiotensina 1-9 como péptido inactivo (Soler et al, 2008). ACE₂, se encuentra distribuida principalmente en el epitelio pulmonar, en los neumocitos tipo 2, lo que explica la especial susceptibilidad de dicho órgano a la infección por SARS-CoV-2; sin embargo, también existe expresión de esta enzima en cardiomiocitos, riñones, testículos, sistema nervioso central, placenta y tracto gastrointestinal (Soler et al, 2008; Yalcin et al, 2021), con altas concentraciones de esta en el íleon y colon (Guo et al, 2021). Se ha comprobado que la afinidad de SARS-CoV-2 hacia ACE₂ es entre 10-20 veces mayor que la presentada por SARS-CoV lo que podría explicar en parte sus características de alta infecciosidad (Yalcin et al, 2021). Las funciones principales de la proteína S son la

unión al receptor celular específico (ACE_2) y mediar la fusión de sus membranas, además es el principal inductor para la generación de anticuerpos neutralizantes (Decaro et al, 2020).

Resulta lógico, que uno de los mayores esfuerzos de la investigación en vacunas anti SARS-CoV-2, se centre en la generación de inmunidad contra la proteína S. Con esta finalidad, han sido utilizadas diversas plataformas/ tecnologías vacunales como lo es el uso de vectores virales para la expresión directa de la proteína en cuestión, vacunas basadas en ácidos nucleicos como RNAm y DNA, además de la síntesis de la proteína S recombinante (Hartenian et al, 2020), tal es el caso de la vacuna utilizada en el presente estudio.

2.5. Mecanismo de infección.

Una vez que SARS-CoV-2 ha ingresado al organismo y ha evadido la respuesta inmune de manera suficiente para llegar al contacto con su célula diana, este procede a unirse a su receptor. Una vez que la subunidad S1 de la proteína S se ha unido a ACE_2 , esta es escindida y activada por medio de la actividad proteolítica de TMPRSS2 a nivel de membrana y Catepsina L a nivel endosomal en caso de usar la vía de endocitosis. El sitio S1/S2 de SARS-CoV-2 sufre una escisión por la enzima furina durante su biosíntesis, pre activandola para su fusión con la célula a infectar. Esto se especula que le facilita la exposición de los sitios S2' para su posterior proteólisis por medio de TMPRSS2 (Hartenian et al, 2020; Jackson et al, 2021).

Existen dos vías para la internalización del material viral, la primera se da por unión a ACE_2 y la subsecuente acción de TMPRSS2 cambiando a la conformación de post fusión y dando lugar a la liberación del péptido de fusión de la subunidad S2 iniciando la formación de un poro que se va agrandando conforme las membranas, viral y celular se fusionan por completo, dando acceso del genoma al citoplasma (Hartenian et al, 2020; Jackson et al, 2021). La otra posible vía es la endocitosis, esta se lleva a cabo cuando el complejo Virus- ACE_2 se encuentra desprovisto de proteasas TMPRSS2 para ser activado; por tanto, se activa la endocitosis mediada por clatrin donde la catepsina L promoverá la fusión con la membrana del endosoma para la liberación del genoma viral al citoplasma (Jackson et al, 2021).

Un conjunto de Nsp's (Nsp2- 16) instauran complejos de replicación y transcripción (RTC) que como se infiere, es el lugar en el interior de la célula infectada donde se copia y transcribe la información genómica y sub genómica, esta última necesaria para la traducción de las proteínas estructurales y accesorias (Hartenian et al, 2020).

La replicación del material genético de SARS-CoV-2 está mediado por un multicomplejo proteico conformado por la RNA polimerasa dependiente de RNA (Nsp12); 2 factores de procesividad (Nsp 7 y Nsp8), una helicasa (Nsp13), una proteína de unión de hebra simple (Nsp9), una exonucleasa con actividad de prueba de lectura (Nsp14), y enzimas de encasquetamiento como Nsp 10 y Nsp 16 (Hartenian et al, 2020; Rastogi et al, 2020).

Los RTC generan intermediarios completos de RNA (-), lo que se usa posteriormente como molde para la síntesis de RNA (+) genómico, para el empaquetamiento de nuevos viriones y RNA subgenómico para la síntesis de las proteínas S, E, M y N así como proteínas accesorias (Rastogi et al, 2020; Arya et al, 2021).

Posteriormente las proteínas estructurales penetran al interior del retículo endoplásmico, y a su vez la proteína N se une al RNA (+) para la formación del complejo ribonucleoproteico, después las 3 proteínas más el complejo ribonucleoproteico se desplazan hacia los compartimentos ERGIC donde los viriones completan su proceso de ensamblaje y maduración para brotar hacia el exterior de Golgi en el interior de pequeñas vesículas que se dirigirán hacia la membrana plasmática para fusionarse y ser expulsadas al espacio extracelular por medio de exocitosis, una vez en el exterior de la célula los viriones recién expulsados son capaces de infectar una nueva célula (**Figura 5**) (Rastogi et al, 2020; Arya et al, 2021).

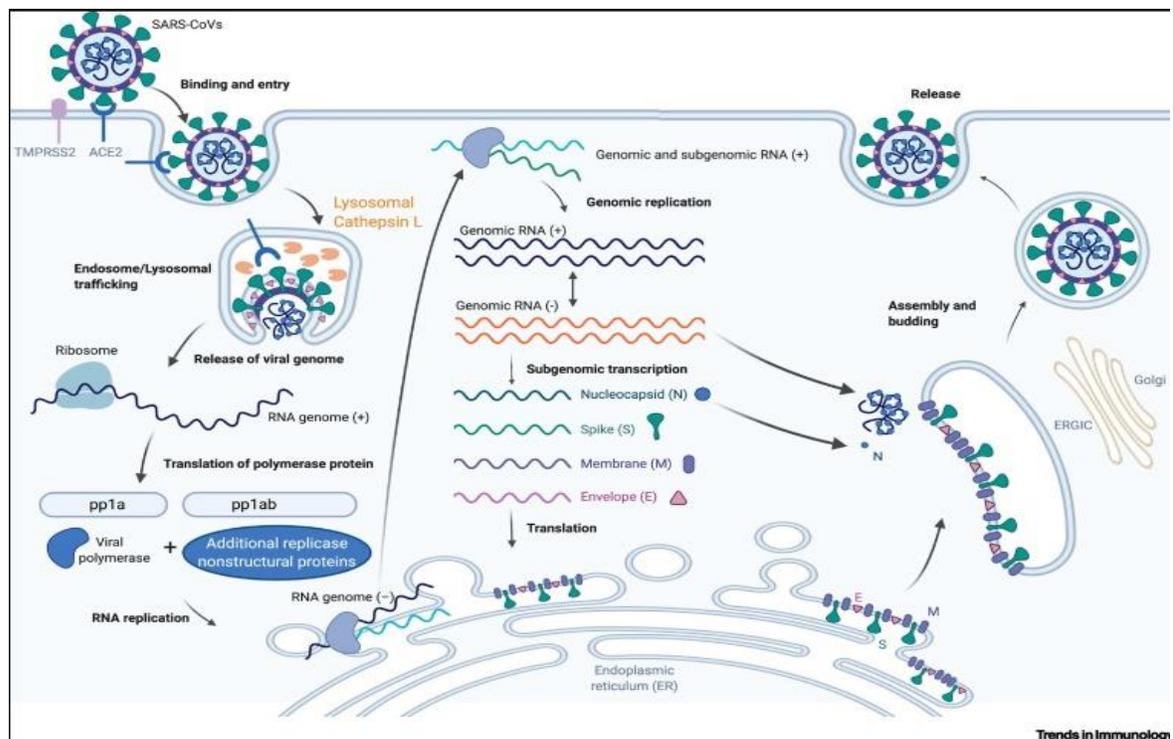


Figura 5. Esquema de la infección y ciclo replicativo de SARS-CoV-2 (Tomado de Harrison et al, 2020; Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis)

2.6. Variantes

Se entiende como variante un genoma viral que ha sufrido mutaciones, y por tanto cambios en su secuencia de nucleótidos de manera natural durante la replicación del mismo (CDC, 2021 (1); Mistry et al, 2022). Dichas mutaciones, podrían en ocasiones generar variantes que podrían limitar el funcionamiento óptimo de la vacunación o de la inmunidad natural en comparación con las variantes que circulaban previamente. Estas mutaciones se llevan a cabo mayoritariamente en la secuencia de la proteína S, concretamente en la región del RBD (Mistry et al, 2022).

Una de las principales preocupaciones es la presencia de nuevos linajes con mutaciones asociadas a la capacidad de evitar el reconocimiento de la proteína S con anticuerpos neutralizantes lo que se conoce como evasión inmune (Jackson et al, 2021). A pesar de los cambios constantes generados en el genoma de SARS-CoV-2, su tasa de mutación es mucho menor que otros virus de RNA debido la presencia de la enzima EXoN (Nsp14) con actividad exonucleasa y prueba de lectura que permite la corrección de errores y la fidelidad durante el proceso de replicación (Mistry et al, 2022; Hirabara et al, 2022).

Además de los posibles errores de replicación, existen otros eventos que permiten al agente viral la generación de variantes con posible capacidad de evasión inmune o presentar alteraciones biológicas en contraste con variantes de circulación anterior, como lo son la presión selectiva ejercida por medio de algunos tratamientos como terapias de anticuerpos monoclonales, suero hiperinmune o vacunas; además de ciertos factores ambientales que podrían influir en dicha selección. Ha de tomarse en cuenta también, como recurso de variación genética, la presión ejercida por medio de la edición o modificación de RNA viral por medio de enzimas editoras de RNA presentes en el hospedador, además de la posibilidad de recombinación entre variantes, la adaptación a nuevas especies animales y la subsecuente transmisión zoonótica; así como la evolución acelerada y la prolongación de la diseminación de partículas virales en pacientes inmunocomprometidos con cursos crónicos de COVID-19 (**Figura 6**) (Mistry et al, 2022).

Actualmente la OMS usa dos designaciones para hacer referencia a las variantes que presentan ciertos cambios en su comportamiento que pueden involucrar la disminución de la eficacia de tratamientos y medidas inmunoprolifácticas, así como la severidad de la enfermedad y la capacidad de transmisión. Estas son denominadas como Variantes de Interés (VOI) y Variantes de Preocupación (VOC) (WHO, 2022) (2) los criterios de dicha clasificación se describen a continuación.

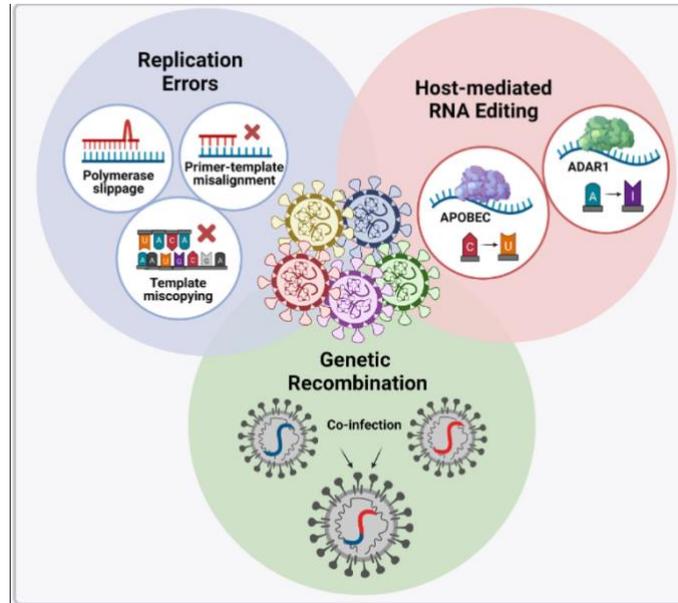


Figura 6. Factores implicados en el surgimiento de nuevas variantes (Tomado de Mistry et al, 2022)

- **Variantes de Interés (VOI)**

Presencia de cambios en el genoma que suponen la alteración de infecciosidad, virulencia, evasión inmune o de detección diagnóstica y tendencia creciente de casos, así como cualquier característica que sugiera un nuevo riesgo para la salud pública (WHO, 2022). (2)

Las VOI reconocidas por la OMS se basan en modelos predictivos que muestran la posibilidad de alteraciones en la transmisión, virulencia y efectividad de la inmunidad adquirida por vacunas. Estos son los linajes Lambda (C37) cuyo primer hallazgo fue realizado en Perú a finales de 2020 y Mu (B.1.621) emergida en Colombia a inicios de 2021 (Mistry et al, 2022; WHO, 2022) (2). Además, existen otros linajes bajo monitoreo denominadas: B.1.1.318, C.1.2 y B.1640 emergidas a mediados y finales del año 2021 (WHO, 2022).

- **Variantes de Preocupación (VOC)**

Variante para la cual existe evidencia del aumento de la transmisibilidad (mayor cantidad de casos), aumento de la virulencia (mayor cantidad de casos graves) y cambios en la presentación clínica de la enfermedad; así como la disminución de eficacia de las medidas de salud pública, diagnóstico, tratamientos, vacunas y reducción de los niveles de neutralización viral (WHO, 2022).

Las VOC que han emergido, poseen características comunes en las mutaciones de la proteína S. Existen 4 modificaciones de aminoácidos presentes en el RBD que han sido el principal foco de estudio para evaluar su impacto en la virulencia y evasión inmune. Estas son: N501Y, común para Alpha, Beta, Gamma y Omicron; E484K/Q/A y K417T/N presentes en Beta, Gamma y Omicron; y L452R que solamente es presentado por el linaje Delta (**Cuadro 3**) (Mistry et al, 2022).

Las variantes de SARS-CoV-2 que han emergido recientemente poseen características de mayor transmisibilidad y sensibilidad reducida a los mecanismos inmunes, resulta claro que el surgimiento de variantes supone riesgos para la efectividad de las vacunas y el establecimiento de una inmunidad de largo plazo por lo que resulta crucial la determinación de la efectividad de las vacunas contra las variantes en circulación actual (Mistry et al, 2022).

Cuadro 5. Variantes de interés (VOI) de SARS-CoV-2.

Variante de preocupación	Fecha de detección.	Lugar de detección	Características
Alpha Linaje B.1.1.7 (20I/S.501Y.V1)	Septiembre/2020	Reino Unido	Presenta mayor afinidad a ACE-2 y posee entre 40 y 70% de mayor transmisibilidad que la variante original de Wuhan. Posee 23 mutaciones en los genes que codifican para las proteínas S, N y ORF 8 (Hirabara et al, 2022; CoVariants, 2022).
Beta Linaje B.1.351 (VH/ S.501Y.V2)	Octubre/2020	Sudáfrica	Posee varias mutaciones que le confieren mayor capacidad de supervivencia y adaptación en comparación con las variantes previas a su surgimiento, así como transmisibilidad y reinfecciones (Hirabara et al, 2022). Presenta reducción de eficacia a tratamientos con anticuerpos monoclonales y suero convaleciente (CoVariants, 2022).
Gamma Linaje P.1 (20J/ S.501Y.V3)	Enero/2021	Japón	Posee alta transmisibilidad, elevada afinidad a ACE2, es capaz de realizar evasión del sistema inmune, además del riesgo de reinfección (Hirabara et al, 2022; CoVariants, 2022).
Delta Linaje B.1.617	Diciembre/2020	India	Posee 8 mutaciones en la proteína S, que le confieren mayor eficiencia en cuanto a transmisibilidad con un R0 de 5.08, así como un mayor riesgo de hospitalización y evasión inmune. Posee mutaciones asociadas a una alta afinidad a ACE-2 y relacionadas con una alta carga viral. Todas las vacunas aprobadas a la fecha son efectivas contra los sublinajes de B.1.617 (Hirabara et al, 2022; Mistry et al, 2022).

<p>Omicron</p> <p>Linaje B.1.1.529 (21K)</p> <p>Sublinajes: BA.1, BA.2, BA.3, BA.4 y BA.5</p>	<p>Noviembre/2021</p>	<p>Sudáfrica</p>	<p>Es el linaje predominante en las 6 regiones geográficas de la OMS. Posee 50 mutaciones, 30 de las cuales se encuentran en el gen codificante para la proteína S y le confieren mayor transmisibilidad, infectividad, afinidad de receptor, reinfección y evasión inmune. Así como mutaciones en el gen codificante para la proteína N relacionadas a una mayor carga viral. No existe evidencia de mayor riesgo de enfermedad severa, ni evasión inmune generada a cualquiera de las vacunas aprobadas actualmente (Hirabara et al, 2022; ECDC, 2022; CoVariants, 2022; WHO, 2022).</p>
--	-----------------------	------------------	--

2.7. COVID-19

Se trata de la denominación que la OMS dio a la enfermedad emergente cuyo agente etiológico es SARS-CoV-2. Los primeros casos ocurrieron durante la mitad del mes de diciembre de 2019 en Wuhan, China. Durante el rastreo epidemiológico se observó que los 4 pacientes infectados se encontraban relacionados con el mercado de Huanan donde distintas especies de animales silvestres y domésticas son comercializadas (Chams et al, 2020).

En diciembre 30, por medio de secuenciamiento genómico y análisis bioinformático se reveló la presencia de material genético típico de *Betacoronavirus 2B* con un 96% de homología de sus secuencias con RaTG13-CoV. El 8 de enero fue anunciado oficialmente que el agente causal se trataba de un *Betacoronavirus* emergente inicialmente denominado 2019-nCoV y un mes más tarde SARS-CoV-2 (Chams et al, 2020).

En enero 13, se notificó del primer caso fuera de China, en Tailandia. En enero 23 las autoridades chinas ordenaron el confinamiento estricto de Wuhan. En enero 30 la OMS declaró emergencia global y el 11 de marzo fue oficialmente declarada como pandemia (Cham et al, 2020).

2.7.1 Transmisión.

El mecanismo para la transmisión del agente en cuestión se lleva a cabo durante el contacto estrecho humano-humano mediante gotas y aerosoles despedidos por nariz y boca de individuos infectados, generados al toser, estornudar, respirar y hablar o cantar. La infección se puede llevar a cabo cuando estas micropartículas son inhaladas o tienen contacto con las

mucosas nasal, oral y ocular (Rastogi et al, 2020; WHO, 2021) (3). La propagación de las partículas virales suele darse mayoritariamente en lugares concurridos en ambientes con poca ventilación en los que las personas suelen pasar largos periodos, debido a la capacidad de los aerosoles para mantenerse en suspensión en el aire durante cierto tiempo antes de depositarse en las superficies, los viriones aerosolizados poseen una vida media de 1 a 3 horas (Wang et al, 2021; WHO, 2021) (3). A su vez, un individuo podría contraer la infección al mantener contacto con superficies o fomites contaminados y posteriormente realizar contaminación cruzada tocando sus ojos, nariz o boca (WHO, 2021).

Durante la primera mitad de 2021, tanto OMS como CDC reconocieron de manera oficial la inhalación de aerosoles como ruta de transmisión de SARS-CoV-2 (Wang et al, 2021).

El número básico de reproducción o R_0 se refiere al promedio esperado de casos adicionales de infecciones que un solo caso es capaz de generar. Dicha estimación para el SARS-CoV-2 ha cambiado a lo largo del curso de la pandemia, inicialmente se consideraba entre 2 a 2.7 (Chams et al, 2020), posteriormente con la variante Delta se estimó un R_0 de 3.2 a 8 y recientemente en 2022 con la variante Omicron y sus subvariantes se estima una transmisibilidad aproximadamente 3.2 veces mayor que Delta (Fan et al, 2022).

2.7.2 Signos, síntomas y diagnóstico.

El curso clínico de COVID-19 es similar al síndrome agudo respiratorio severo provocado por SARS-CoV y al síndrome respiratorio de oriente medio donde la mayoría de los casos, aproximadamente el 80% de estos son leves y autolimitantes, por tanto, cerca del 20% restante de la totalidad de los casos resultan en complicaciones que agravan el cuadro, y desembocan en falla multiorgánica o ARDS (Rastogi et al, 2020).

Según la OMS, el tiempo que transcurre desde el inicio de la infección, hasta la aparición de los signos, denominado como periodo de incubación, suele ser generalmente de 5-6 días; sin embargo, podría oscilar desde 1 hasta 14 días dependiendo de la variante en cuestión (WHO, 2021).

Entre las manifestaciones clínicas más frecuentes, se encuentra la presencia de pirexia, tos improductiva, fatiga, congestión nasal y rinorrea, disnea, cefalea, mialgia, dolor de articulaciones, dolor de garganta y pecho (Wang et al, 2020; Rastogi et al, 2021; WHO, 2021) (5). Actualmente se ha documentado también la presencia de síntomas índole gastroentérica principalmente diarrea, náusea, vómito y dolor abdominal; sin embargo, se reporta también la presencia de otros síntomas relacionados como anorexia, reflujo, hematoquecia (Guo et al, 2021). Además, existen reportes de casos de COVID-19 que desembocan en daño al miocardio y otras complicaciones de índole cardíaca y neurológica como mialgias, mareo, hemorragia intracraneal y desórdenes del gusto y olfato como anosmia, ageusia y parosmia (Wang et al, 2020).

Existen 3 escenarios para la clasificación de la severidad de los cuadros por COVID-19. El primero, el curso leve, donde el paciente suele presentar fiebre, fatiga, podría no presentar, o presentar neumonía leve y en el estudio imagenológico se pueden encontrar opacidades de “vidrio esmerilado”. En el cuadro severo, se presenta disnea moderada, la saturación de oxígeno suele encontrarse por debajo del 93%, la frecuencia respiratoria se encuentra mayor o igual a 30 respiraciones por minuto, presencia de infiltrado pulmonar y el paciente suele requerir UCI. El cuadro de mayor riesgo para la vida del paciente se le denomina como crítico, en este caso el paciente experimenta ARDS, falla respiratoria, shock séptico, falla multisistémica, acidosis metabólica, así como daño hepático y disfunciones de la coagulación (Wang et al, 2020).

Actualmente se cuentan con tres tipos principales de pruebas para la detección de SARS-CoV-2 y el diagnóstico de COVID-19, estas son:

- **Pruebas moleculares o de detección o amplificación de ácidos nucleicos (NAAT)** como es el caso de RT-PCR o LAMP, son pruebas diseñadas para detectar el RNA viral y diagnosticar una infección activa. Son llevadas a cabo a partir de muestras obtenidas mediante un hisopado nasofaríngeo. Se recomienda su uso dentro de las 2 primeras semanas del inicio de la presentación de los signos clínicos (Peeling & Heymman et al, 2021).
- **Pruebas de detección de antígeno viral** Son realizadas preferentemente a partir de muestras obtenidas mediante hisopados nasofaríngeos. Estas se encuentran diseñadas para la detección de alguna proteína del virus como S o N y tienen como objetivo el diagnóstico de una infección activa (Peeling & Heymman et al, 2021).
- **Pruebas de serología** se realizan a partir de una muestra de sangre. Están especializadas en la detección de anticuerpos específicos generados contra SARS-CoV-2 posterior a la vacunación o a la infección natural. Se recomienda su realización después de 2 semanas posteriores a la aparición de los signos clínicos, una vez que se hayan generado anticuerpos, y los resultados pueden ir desde minutos, hasta 1 día. Este tipo de pruebas son usadas principalmente para el monitoreo epidemiológico y no son recomendadas para el diagnóstico de COVID-19 (Peeling & Heymman et al, 2021).

2.8. Epidemiología y control

La severidad de los cuadros de COVID-19 afectan diferente a los individuos dependiendo su predisposición genética, estado del sistema inmune y las enfermedades asociadas al sistema

respiratorio. La edad también es un factor a considerar debido a que las personas mayores de 60 años presentan mayor riesgo de padecer la enfermedad grave (Rastogi et al, 2020).

Las comorbilidades que están relacionadas con la severidad de COVID-19 incluyen los desórdenes cardio y cerebrovasculares, diabetes, obesidad, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), neumonía, hipertensión pulmonar, enfermedad renal crónica, falla hepática y cáncer; así como trastornos de carácter autoinmune (Rastogi et al, 2020; Sajdel-Sulkowska, 2021). Los dos sexos son similarmente susceptibles a la infección y presencia de la enfermedad; sin embargo, la tasa de mortalidad es 2.4 veces mayor en hombres, en los que se han encontrado niveles elevados de ACE₂ en plasma dotando al virus de la disponibilidad de receptores para su internalización; esta predisposición podría estar relacionada también con factores inmunológicos, genéticos, endocrinos y sociales (Rastogi et al, 2020).

De manera general, las medidas para el control de los coronavirus humanos requieren un buen sistema de vigilancia de salud pública de salud y proveedores de esta, así como la disponibilidad de pruebas diagnósticas y el confinamiento de ser necesario. En el caso de brotes internacionales, es crucial la cooperación entre entidades gubernamentales, autoridades en materia de salud y proveedores de esta. De manera paralela, durante eventos de brotes de importancia veterinaria suelen llevarse a cabo decisiones sobre medidas drásticas como el rifle sanitario de lotes completos de animales para frenar la transmisión (Fher & Pearlman, 2015).

2.9. Respuesta inmune contra SARS-CoV-2.

El importante rol que juega la inmunidad innata en la defensa contra infecciones ocasionadas por virus, incluida la producida por SARS-CoV-2 se puede demostrar por los múltiples mecanismos de evasión que han desarrollado durante las diferentes etapas de la infección viral. En este caso, si la reacción innata es exitosa se obtiene una protección efectiva y rápida, o la resolución satisfactoria de la enfermedad, tal como sucede en personas jóvenes, adultos asintomáticos o con sintomatología leve, así como en los reservorios naturales del virus (Christie *et al.*, 2021).

Como primera línea de defensa, juega un papel importante en la detección y control inicial de la infección, al ingresar los viriones de SARS-CoV-2 al tracto respiratorio superior, se encuentra con factores de defensa inespecíficos, mecánicos y físicos como los cilios, tos, los estornudos y el moco secretado por células caliciformes. Este, además de suponer una barrera u obstáculo físico entre el virus y la célula, posee factores químicos que interactúan con la partícula viral para evitar la infección como la presencia de mucinas, defensinas, histatinas y protegrinas, además de la presencia de inmunoglobulinas de clase IgA (Kuby, 2018; Mistry et al, 2022).

Durante las infecciones por SARS-CoV-2 suelen observarse alteraciones en la regulación de la activación del sistema de complemento. Derivado de esto, algunos de sus componentes, como la fracción C5 que induce la secreción de componentes proinflamatorios como IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF, lo que podría contribuir a la exacerbación de la inflamación, la disfunción de células endoteliales y los subsecuentes eventos trombóticos (Rodrigues et al, 2020).

Una producción adecuada y temprana de efectores celulares y citoquinas antivirales está asociada con un control exitoso de la infección por SARS-CoV-2; sin embargo, las respuestas mediadas por INF-1 y los niveles elevados de citoquinas antivirales pueden desembocar en el síndrome de liberación de citoquinas comúnmente llamado “tormenta de citoquinas”, característico de los cuadros graves de COVID-19, así como otras enfermedades causadas por agentes virales como *Influenzavirus* o SARS-CoV. Este se caracteriza por una liberación prolongada y descontrolada de citoquinas y agentes proinflamatorios, que podrían promover la secreción masiva de más citoquinas, al realizar el estímulo de células inmunitarias para su producción, así como el reclutamiento de las mismas en el sitio de infección, (Kuby, 2018; Hirano et al; 2020; Christie et al, 2021; Mistry et al, 2022).

Respecto a la respuesta celular, las células T dirigidas contra SARS-COV-2 son detectadas alrededor de una semana después de la aparición de los signos clínicos. La subpoblación CD8 + es importante para la destrucción de células infectadas por el virus mediante mecanismos de citotoxicidad mediados por perforinas y granzimas. y son capaces de usar anticuerpos específicos para mediar su destrucción. A su vez, las células CD4 + auxiliares son responsables de la producción de citoquinas para la estimulación de células CD8 + células B y macrófagos (Kuby, 2018; Tay et al, 2020; Zheng et al, 2022).

Las células T y B específicas de memoria persisten durante varios meses en pacientes recuperados de COVID-19 y poseen la capacidad de montar respuesta antiviral, en el caso de las CD4+ y CD8+ específicas contra SARS-CoV-2. Éstas disminuyen después de la infección con una vida media aproximada de 3 a 5 meses (Christie et al, 2021).

La respuesta humoral durante la infección por SARS-CoV-2 juega un papel crucial en la defensa antiviral. Está mediada por anticuerpos sintetizados por células plasmáticas (Mistry et al, 2021; Zheng et al, 2022) que poseen una alta especificidad y están dirigidos contra múltiples epítomos presentes principalmente en la proteína S. Además, se han reportado anticuerpos contra la proteína M, N y ORF3a. Estos pueden presentar reacciones cruzadas contra las proteínas de membrana y nucleocápside de otros *Betacoronavirus* (Christie et al, 2021).

La proporción de células B de memoria específicas para el RBD de SARS-CoV-2 en sangre es significativamente mayor en personas que cursaron una infección sintomática en contraste con los conteos bajos en individuos asintomáticos (Zheng et al, 2022).

Las células B de memoria específicas contra la proteína S y N de SARS-CoV-2 son persistentes, se mantienen estables o incrementan hasta 6-8 meses después de la infección, y

son capaces de montar una respuesta antiviral efectiva durante futuras exposiciones al agente (Christie et al, 2021; Mistry et al, 2021). De igual manera, la maduración constante de células B plasmáticas tiene como consecuencia la producción de anticuerpos neutralizantes incluso durante una reinfección (Mistry et al, 2021).

Al ser el RBD el sitio con epítomos inmunodominantes en SARS-CoV-2, se ha demostrado que el 90% de la presencia de respuesta humoral neutralizadora se trata de anticuerpos dirigidos contra el RBD. Aunque también se registra actividad humoral fuerte contra la proteína N (Piccoli et al, 2020).

A diferencia de varias especies de primates, incluida el ser humano, cuya clase predominante de anticuerpos en calostro y leche es IgA; en los rumiantes, concretamente en los bovinos, la subclase de anticuerpos que se encuentran presentes en mayor cantidad en ambas secreciones son IgG₁; sin embargo, en las demás superficies corporales de estos animales, además de esta subclase, se encuentra presente en altas cantidades IgA. A su vez IgG₂ está presente en la saliva y el intestino. Se estima de manera general, que las inmunoglobulinas de clase IgG poseen una respuesta más efectiva en la protección de las vías respiratorias que en el tracto gastrointestinal (Hurley & Theil, 2011; Tizard, 2018).

Los anticuerpos dirigidos contra el RBD de la proteína S han demostrado capacidad de neutralización viral, y se han identificado las clases IgM, IgG e IgA (Mistry et al, 2021).

2.10. Infecciones por SARS-CoV-2 en otras especies

Como se ha revisado anteriormente, los miembros de la familia *Coronaviridae* son capaces de infectar un amplio rango de hospedadores. Además, poseen la capacidad de adaptación a nuevas especies mediante eventos de mutación y recombinación. Cada uno de los 7 coronavirus que infectan al humano tienen probable origen en reservorios roedores y quirópteros, y como interfaz entre estos y el ser humano existen animales silvestres que han fungido como huéspedes intermediarios (Meekins & Grandreault, 2021).

Se tiene conocimiento de que algunos sitios del receptor ACE-2 se encuentran altamente conservados entre especies de los órdenes: *Carnivora*, *Lagomorpha*, *Proboscidea*, *Artiodactyla*; *Chiroptera*, *Rodentia*, *Sirenia* y *Perissodactyla*, indicando un fuerte riesgo de integración de reservorios en poblaciones silvestres (Sharun & Tiwari, 2021).

La transmisión continúa sostenida de SARS-CoV-2 en la población humana, da lugar a la posibilidad de brotes asociados a antropozoonosis, en los que un humano positivo al virus podría infectar a animales domésticos o silvestres estableciendo de esta manera incidentalmente nuevos reservorios. Una vez instaurado en la población de animales y logrando una transmisión sostenida es probable que el virus requiera mutar para posiblemente

adaptarse al nuevo reservorio, lo que supone riesgos futuros para la población humana debido a la reemergencia de brotes esporádicos de COVID-19 (Meekins & Grandreault, 2021; Sharun & Tiwari, 2021).

Aproximadamente 30 especies de animales domésticos y silvestres han dado positivo a SARS-CoV-2 tanto en infecciones experimentales como naturales. Entre estas especies se encuentran animales de compañía como perros (*Canis lupus familiaris*) quienes cursan infecciones asintomáticas o leves, y presentan una deficiente replicación y transmisión viral, generando una robusta seroconversión anti SARS-CoV-2; y gatos (*Felis catus*), en estos últimos se ha documentado una mayor capacidad de transmisión que entre caninos; sin embargo cursan por una infección asintomática o leve con cambios principalmente a nivel histológico. Algunos otros felinos mayores cautivos como leones, tigres, pumas y leopardos de las nieves, también han dado positivo al virus contagiándose por medio de sus cuidadores (Meekins & Grandreault, 2021).

Por su parte se ha demostrado que hamsters (*Mesocricetus auratus*, *Cricetulus griseus*, *Phodopus campbelli*, *Phodopus sungorus* y *Phodopus roborovskii*) son altamente susceptibles a la infección por SARS-CoV-2, especialmente esta última especie que presenta un cuadro terminal similar a los cursos graves por COVID-19 en humanos. Estudios han demostrado cantidades elevadas de RNA subgenómico de SARS-CoV-2 en el tracto respiratorio de *Mesocricetus auratus* que fueron infectadas con la variante B.1.617 (Meekins & Grandreault, 2021).

Los estudios practicados en otro grupo de roedores de interés epidemiológico como lo es el ratón común (*Mus musculus*) han demostrado resistencia a la infección por la variante inicial de Wuhan, pero muestran susceptibilidad a la infección por variantes portadoras de la mutación N501Y en el gen que codifica para la proteína S (Meekins & Grandreault, 2021).

Un par de especies de interés productivo altamente susceptibles a la infección por SARS-CoV-2, son los mustélidos del género *Mustela* y *Neovison*. Entre los cuales se ha confirmado la transmisión sostenida por medio de aerosoles y contacto directo. La susceptibilidad es mayor en minks, en cuyas poblaciones han existido brotes originados por medio de zoonosis inversa, y de los cuales se ha confirmado su transmisión potencial hacia el ser humano y otros animales como perros y gatos. Por lo que se ha optado incluso por el rifle sanitario de unidades productivas de estos animales en Europa y Estados Unidos. Actualmente está considerado uno de los animales domésticos con mayor relevancia como posible reservorio del virus en el medio silvestre siendo además la primera especie en vida libre que ha sido testada positiva a SARS-CoV-2 (Meekins & Grandreault, 2021).

Algunas otras especies que han demostrado susceptibilidad a las infecciones por SARS-CoV-2 son: *Nyctereutes procyonoides*, *Oryctolagus cuniculi*, *Odocoileus virginianus*, *Aonyx cinereus*, *Mephitis mephitis* y *Tupaia belangeri*; además de primates de los géneros *Macaca*,

Chlorocebus, *Papio*, *Callithrix* y *Gorilla*), además los orangutanes y bonobos del zoológico de San Diego, han sido los primeros animales en recibir una vacuna anti SARS-CoV-2, creada por el laboratorio Zoetis. Esta también ha sido probada en perros, gatos y minks; así como su uso en chimpancés, hienas y pumas. Especies domésticas empleadas para consumo humano como *Bos taurus*, *Gallus gallus* y *Sus scrofa* han demostrado baja susceptibilidad al agente en cuestión (Meekins & Grandreault, 2021; Sharun & Tiwari, 2021).

2.11. Vacunas contra SARS-CoV-2

La vacunación tiene por objetivo inducir una reacción inmune suficiente para limitar o evitar la infección por el organismo patógeno natural, así como prevenir sus consecuencias negativas (Bowersock & Martin, 1999). Deben satisfacerse dos criterios previos al uso de la vacunación en una población los cuales se basan en corroborar que el sistema inmune generará protección contra el agente en cuestión y tener la certidumbre de que los riesgos en el uso de una vacuna no superen los riesgos de contraer la propia enfermedad (Bowersock & Martin, 1999; Kuby, 2018).

En el caso de ciertos patógenos, es viable el uso de la partícula viral completa atenuada o modificada en cuyo empleo ideal provoca una infección asintomática con completa recuperación, genera una robusta inmunorreacción predominantemente con linfocitos TCD8+, se requieren menores cantidades de dosis vacunales, generan inmunidad a largo plazo y no requieren la adición de adyuvantes (Bowersock & Martin, 1999; Tizard, 2018).

Por su parte las vacunas de virus inactivado o muerto, así como los antígenos proteicos obtenidos mediante tecnología recombinante (categoría I) que conllevan un proceso de purificación, son deficientes para generar inmunorreacción por sí mismas (Tizard, 2018) debido a que no se presenta una infección activa, la inmunidad humoral predomina sin montarse reacción celular (Sharma & Hinds, 2012). Estas vacunas suelen requerir el uso de otra sustancia (adyuvante) que estimula la respuesta inmune y aumenta la respuesta del hospedador contra antígenos no específicos. Estos trabajan mediante el secuestro de antígenos restringidos en un área específica generando depósitos que se encargan de realizar una continua estimulación antigénica a lo largo del tiempo (Jang et al, 2013) y permanecen accesibles a linfocitos reactivos e inducen a células presentadoras de antígeno a expresar moléculas coestimuladoras como CD80 (Tizard, 2018) Dicho efecto suele ser requerido por las vacunas formuladas a base de subunidades proteicas (Jang et al, 2013).

Concretamente, los adyuvantes agua-aceite, como el utilizado durante este estudio, son conocidos por facilitar el consumo por células presentadoras de antígeno, mejorando su procesamiento y presentación mediante moléculas de MHC desencadenando reacciones celulares y humorales (Klimka et al, 2015)

A la fecha 6 vacunas han sido aprobadas por la Administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos (FDA) para su uso de emergencia en seres humanos. La mayoría de estas, se encuentran diseñadas contra la proteína S, debido a su elevada inmunodominancia. La tecnología de estas vacunas está basada en vectores virales, moléculas de mRNA y basadas en subunidades o proteína completa; así mismo existen vacunas aprobadas, basadas en el virión inactivado (Mistry et al, 2021).

Por su parte, la OMS reconoce 11 vacunas para uso de emergencia y México a su vez, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), ha autorizado a la fecha el uso de emergencia de 9 vacunas (**Cuadro 3**) (Pfizer-BioNTech, AstraZeneca, CanSino Biologics, Sputnik V, Sinovac, Covaxin, Janssen, Moderna, Sinopharm) (COFEPRIS, 2021) (7). Definir cuáles regiones de los antígenos de SARS-CoV-2 son inmunodominantes es importante para el diseño de las vacunas con la finalidad de asegurarse de que estas no solo contengan regiones a las que son dirigidas anticuerpos neutralizantes como el RBD de la proteína S, sino que también contenga regiones que tengan la capacidad de promover una buena respuesta cooperadora de células CD4+ (Tarke et al, 2021).

El uso de otras proteínas del virión ha sido tomado poco en cuenta, siendo la proteína S completa o múltiples fragmentos de RBD, el principal blanco de las vacunas contra SARS-CoV-2. Cabe señalar que a pesar de que la proteína N se encuentra en gran cantidad y se presenta una robusta inmunidad humoral en su contra, no se ha considerado como blanco de las vacunas debido a las reacciones de infiltración eosinofílica presentadas en los ensayos realizados con la proteína homóloga de SARS-CoV (Piccoli et al, 2020; Pollet et al, 2021).

Durante décadas, la tecnología recombinante ha demostrado ser eficiente, relativamente barata y ampliamente disponible permitiendo la rentabilidad de la producción de proteínas en microorganismos y otros sistemas de expresión. Otra ventaja de esta tecnología es su carácter no replicativo y libre de componentes infecciosos en su composición, lo que les confiere mayor seguridad que las vacunas diseñadas con la partícula viral atenuada. Con el paso de los años esta tecnología ha sido probada y por lo general resulta inocua y únicamente ha llegado a producir efectos secundarios leves. De acuerdo con las bases de datos de la OMS existen actualmente 16 vacunas basadas en antígenos proteicos recombinantes en fase clínica y 56 en fase preclínica (Pollet et al, 2021).

Por lo que además del uso de la proteína S completa o el RBD, se utilizan vacunas diseñadas con múltiples epítomos sintetizados a partir de péptidos. Como ejemplos de los candidatos a vacuna más avanzados que usan esta tecnología se encuentran: la vacuna UB-612

(COVAXX) en fase clínica 3 y COVOVAX (Serum Institute of India) y NUVAXOVID (NOVAVAX) actualmente aprobadas para su uso (Pollet et al, 2021; WHO, 2022).

Para llevar a cabo la producción de las proteínas recombinantes, pueden utilizarse una variedad de plataformas de expresión, como lo son los sistemas microbianos, dentro de los cuales se pueden encontrar bacterias como *Escherichia coli* y algunas levaduras; así como células de insectos, plantas y mamíferos. Para fines de investigación, *E.coli* ha sido el sistema más usado por su costo y efectividad, además de la rapidez de su crecimiento. Diferentes antígenos vacunales han sido producidos en *E. coli* como lo son la vacuna contra *Borrelia burgdorferi* que previene la enfermedad de Lyme, misma que contiene la lipoproteína OspA y que fue aprobada por la FDA en 1998, posteriormente fue retirada del mercado y mejorada de igual manera en el sistema del agente bacteriano en cuestión, otros ejemplos son las vacunas antimeningocócica contra *Neisseria meningitidis*, Trumenba® de Pfizer utilizando dos variantes del factor de unión a proteína H (fHBP), y la vacuna Bexsero® de GSK que usa tres antígenos (fHbo, NadA y NHBA) igualmente sintetizados a partir de *E. coli*, ambas aprobadas por la FDA en 2014 y 21017. Entre los inconvenientes presentes en este sistema está la falta de modificaciones postraduccionales como la glicosilación, que puede afectar la reacción inmune y por tanto tener como resultado una respuesta fallida a la vacunación, además las modificaciones postraduccionales afectan características de la proteína como la estabilidad y solubilidad, además de su correcto plegamiento y la formación de puentes disulfuro (Pollet et al, 2020).

Las proteínas recombinantes por sí mismas provocan una respuesta inmune débil. Con la finalidad de aumentar esta respuesta, y para el ahorro del antígeno proteico, suele utilizarse adyuvante dentro de la formulación de las vacunas basadas en proteínas. Los adyuvantes a su vez pueden desencadenar receptores celulares específicos e iniciar una respuesta inmune innata en el sitio de la aplicación. Posteriormente estimula el sistema inmune adaptativo por medio de la movilización de células presentadoras de antígeno aumentando la presentación del mismo, a células T CD4 + que posteriormente estimularán la proliferación de células B productoras de anticuerpos específicos y de células T CD8+ (**Figura 7**) (Pollet et al, 2021).

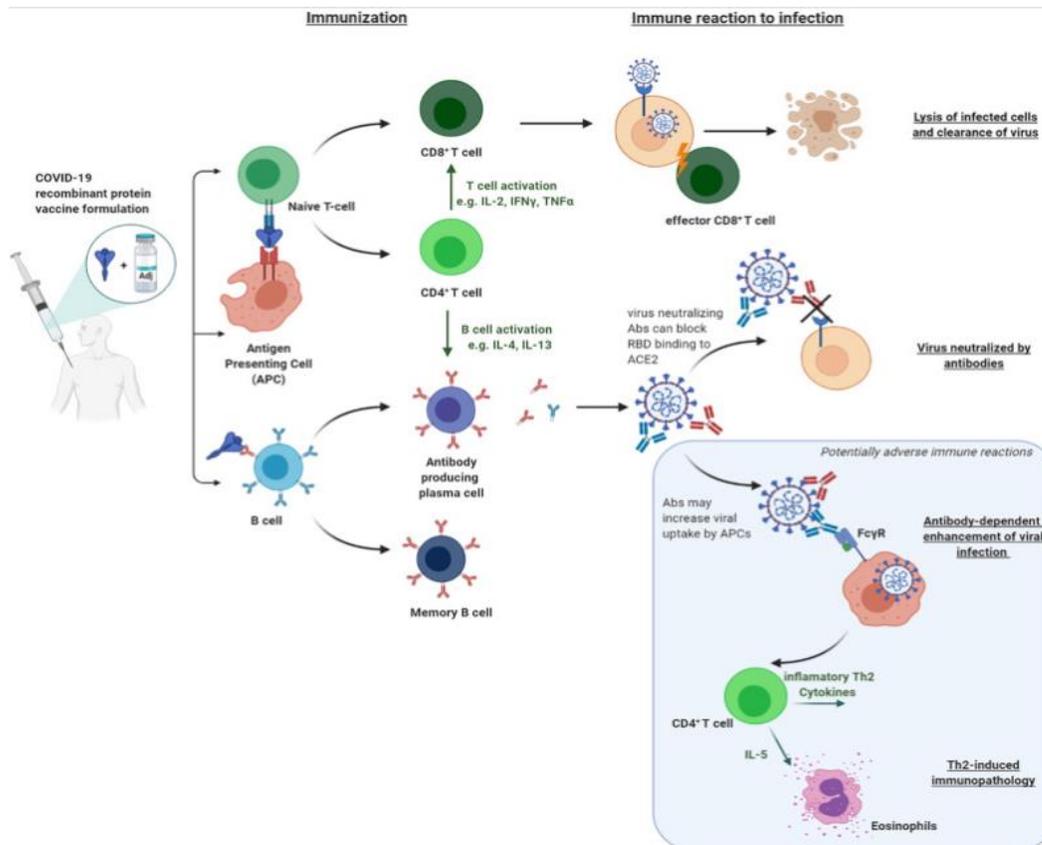


Figura 7. Esquema de la inmunorreacción inducida por medio de vacunas basadas en proteínas recombinantes (Tomado de Pollet et al 2021).

Cuadro 6. Vacunas contra SARS-CoV-2 aprobadas por OMS y COFEPRIS para su uso de emergencia (COFEPRIS, 2022; Mistry et al, 2022; WHO, 2022).

Vacuna	Plataforma vacunal
BNT162b2 & Moderna: Spike Vax (mRNA-1273)	RNA mensajero
Pfizer-BioNTech: Comirnaty (ChAdOx 1)	RNA mensajero
Novavax: Nuvaxovid (NVX-CoV2373)	Subunidad proteica recombinante + adyuvante
Serum Institute of India: COVOVAX (Novavax formulación)	Subunidad proteica recombinante
Johnson & Johnson Janssen: Ad26.COVS.2.S	Vector viral no replicante

Cansino: Covidencia	Vector viral no replicante
Oxford-AstraZeneca: Vaxzevria ZD1222	Vector viral no replicante
Gamaleya: Sputnik V -(Gam-COVID-Vac-rAd26/rAd5)	Vector viral
Sinopharm: Covilo (BBIBP-CorV)	Virus inactivado
Sinovac: CoronaVac	Virus inactivado
Bharat-Biotech: Covaaxin (BBV152)	Virus inactivado

III. HIPÓTESIS

- La proteína quimérica recombinante contra SARS-CoV-2, QUIVAX 17.4 es segura en bovinos y genera la producción de anticuerpos IgG e IgA en suero y leche de bovinos inoculados.

IV.OBJETIVOS

Objetivo general.

- Evaluar la seguridad de la vacuna recombinante Quivax 17.4 en bovinos y la producción de anticuerpos IgG e IgA en suero y leche.

Objetivos específicos.

- Evaluar la seguridad de la vacuna recombinante Quivax 17.4 en bovinos por medio de monitoreo clínico.

- Evaluar mediante la técnica de ELISA, la producción de anticuerpos IgG e IgA en suero de bovinos inmunizados.
- Evaluar mediante la técnica de ELISA la producción de anticuerpos IgG e IgA en leche de bovinos inmunizados

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Obtención del antígeno.

El antígeno consta de una proteína quimérica multipeptídica formada por varios epítomos presentes en el RBD del virus SARS-CoV-2 y una cola de polihistidinas. Este se obtuvo por medio de tecnología recombinante, usando como plataforma de expresión clonas transformadas de *Escherichia coli* BL-21-A1, en las cuales se insertó un plásmido portador del gen codificante para dicha proteína.

Las soluciones de unión, lavado y elución fueron realizadas con 500 mM de NaCl, 20 mM de TRIS, 8 M de urea y 15 mM de imidazol, difiriendo en el pH de cada solución con 8, 6.3 y 4.5 respectivamente.

Se llevó a cabo un precultivo en 250 mL de caldo de lisogenia con 100 µg/mL de ampicilina, mismo que fue sometido a incubación a 37 °C con 150 RPM de agitación durante 12 horas. Posteriormente se realizó el cultivo en biorreactor con 75 mL del preinóculo en caldo de lisogenia con 100 µg/mL de ampicilina. La biomasa se determinó por medio de espectrofotometría con absorbancia de 600 nm a intervalos de 15 minutos durante 3 horas. Se indujo la expresión de la proteína añadiendo 800 mg de L-arabinosa. Una vez finalizado el cultivo, se recuperaron 250 mL de biomasa bacteriana en tubos de 50 mL estériles y fueron sometidos a centrifugación a 13.000 g durante 2 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se almacenó el sedimento a -20°C.

Posteriormente se realizó la extracción proteica realizando la resuspensión del sedimento en PBS estéril (pH 7.4) con 500 mg de lisozima de clara de huevo para su incubación a 37°C con 150 RPM de agitación durante 30 minutos. Después se llevó a cabo choque térmico por tres ocasiones con nitrógeno líquido y baño maría a 56°C. Acto seguido se realizó centrifugación a 4 °C y 15, 700 g para finalizar descartando el sobrenadante. Se continuó con la resuspensión del sedimento con solución amortiguadora de fosfato esteril para repetir la centrifugación a 4°C y 15, 700 g descartando el sobrenadante.

Para finalizar el proceso de extracción se resuspendió el sedimento con solución de unión con pH=8.0 para promover la lisis mecánica mediante el uso de perlas de cristal en agitación durante 30 minutos para su posterior incubación a temperatura ambiente con 1500 RPM.

Para el proceso de purificación de la proteína, se utilizaron columnas por gravedad de cromatografía por afinidad a níquel siendo equilibrada antes de su uso con 4 lavados de 4 mL de solución de unión que posteriormente fue eliminada mediante goteo. Después se añadieron 5 mL de la biomasa en suspensión homogenizándose con la resina de las columnas para posteriormente ser incubado a 4°C durante 12 horas en rotación. Acto seguido, se descartó mediante goteo el contenido líquido y se realizaron 3 lavados de 4 mL de solución de lavado

con pH= 6.3 en rotación para su mezcla a 4°C durante 25 minutos para nuevamente descartar el contenido por goteo.

Finalmente se realizó elución por fracciones usando 1 mL de solución de elución con pH= 4.5 y realizando incubación 4°C durante 1 hora con movimiento rotacional. Posteriormente el contenido fue recuperado en tubos estériles de 1.5 mL y refrigerado a 4 °C. Para la selección de las fracciones se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida 12% a 90 V durante 130 minutos. Una vez seleccionadas, las fracciones fueron almacenadas en tubos de 1.5 mL y selladas con membrana de celulosa para proceder a su diálisis utilizando 400 mL de urea estéril a 7.2 M en agitación constante realizando recambios de solución amortiguadora para replegamiento con pH de 7.4 cada 30 minutos. Una vez terminado el proceso, el contenido se almacenó a 4°C en tubos estériles de 1.5 mL hasta la preparación de las dosis vacunales (Qiagen, 2003).

5.2 Preparación de vacuna, inmunización

La formulación de la vacuna se llevó a cabo en el interior de una cabina de seguridad biológica de clase II. Para las dosis del grupo tratamiento se utilizaron 100 µg del antígeno para la primera inmunización, y 60 µg para la segunda, además de solución amortiguadora (PBS), y adyuvante Montanide™ 71 VG (Seppic, París, Francia); el volumen final de vacuna fue 1 mL por individuo. Se realizó la emulsificación de los componentes durante 13 ciclos de 5 min por medio de sonicación para las dosis de adyuvante y proteína. En ambos casos comprobando el tamaño de las micelas con aumento de 100x cada 3 ciclos, hasta lograr un tamaño homogéneo de 5 µm. Adicionalmente, se realizaron las dosis para el grupo de control, al cual se le administró una emulsión de adyuvante Montanide 71 VG (Seppic, París, Francia) y solución amortiguadora (PBS). Cada vacuna fue preparada dentro de las 24 horas previas a su aplicación y se mantuvieron en refrigeración a 4 °C hasta el momento de la vacunación.

El esquema de inmunización se realizó al día 0 y al día 21, administrando dosis subcutáneas de 1 mL de la vacuna para el grupo de tratamiento, y 1 mL de adyuvante Montanide 71G (Seppic, París, Francia) para el grupo de control. El sitio de aplicación se realizó en la región cervical lateral, previa limpieza y desinfección del área utilizando etanol al 70% y cloruro de benzalconio.

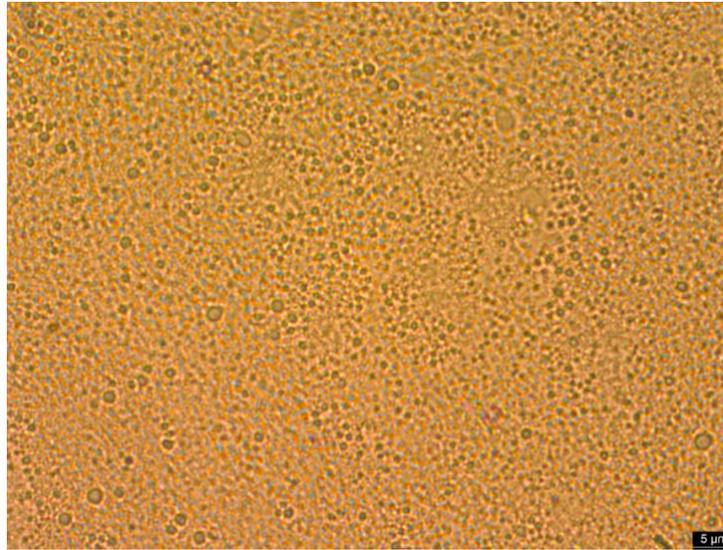


Figura 8. Fotografía a 100x de las micelas menores a 5 μ m resultantes de la emulsificación de la proteína recombinante con el adyuvante oleoso.

5.3 Monitoreo clínico de los animales.

Durante los tres días posteriores a cada aplicación de la vacuna, así como durante los días 10, 21, 31, 67 y 90, fueron monitoreadas las reacciones postvacunales. Se vigilaron las lesiones locales del sitio de aplicación y así como la presencia de fiebre. Además, se practicaron hemogramas en los días 0 y 31. El monitoreo se llevó a cabo a la misma hora en los diferentes días, previo a la manipulación de los animales con la intención de disminuir alteraciones en las constantes fisiológicas derivadas del estrés, el manejo y estímulos medioambientales.

5.4 Colecta de muestras de sangre, leche y traslado al laboratorio

La extracción de sangre para la detección de anticuerpos IgG se llevó a cabo mediante venopunción yugular, previa antisepsia de la región. Para la colecta de la muestra se usaron tubos rojos de 6 mL para las pruebas serológicas y tubos morados de 6 mL con EDTA para la realización de los hemogramas. Las muestras fueron recolectadas los días 0, 10, 31, 67 y 90. Posteriormente se separó el suero mediante centrifugación a 3500 RPM durante 10 min. Finalmente se realizaron alícuotas de suero en tubos de 1 mL, mismas que fueron almacenadas a una temperatura de -20 °C.

Para la detección de anticuerpos específicos en la leche de los bovinos inmunizados se llevó a cabo la recolección de las muestras los días 10, 31, 67 y 90 post inmunización. El ordeño de los animales se realizó bajo condiciones asépticas, se obtuvieron 45 mL de leche de la

primera ordeña del día descartando el primer chorro de leche. Se hicieron alícuotas en tubos de 1 mL y posteriormente se almacenaron a una temperatura -20 °C. Finalmente, se realizó centrifugación de las muestras a 3000 RPM durante 15 min a 4 °C para su uso en el ensayo.

El procedimiento de colecta de las muestras y su procesamiento fue realizado bajo las recomendaciones que refiere la OIE en el “Manual de buenas prácticas de ordeño”, el “Manual de Animales Terrestres” en concreto el capítulo 1.1.1 referente a métodos de muestreo; así como el “Manual de toma, conservación y envío de muestras al laboratorio para enfermedades comunes de los animales” (OIE, 2005; OIE, s.f.).

5.5 Método de Bradford para cuantificación proteica.

Se realizó la cuantificación de proteína para la sensibilización de placas de ELISA por medio del método Bradford, para esto se utilizaron las concentraciones estándar de albúmina sérica bovina (BSA) las cuales son 0.125µg/ mL, 0.25 µg/ mL, 0.5µg/ mL, 0.75 µg/ mL, 1µg/ mL, 1.5µg/ mL, 2µL. Por duplicado, se añadieron 5 µL de cada concentración de BSA y posteriormente se agregaron 245µL de tinción de Bradford. Se añadieron por duplicado 5µL de la proteína a cuantificar a los cuales se les agregaron 245 µL tinción de Bradford. Posteriormente se realizó la lectura de la placa en lector a 595 nm con agitación durante 2 segundos (Noble & Bailey, 2010; Bio-Rad Laboratories, 2010).

5.6 Determinación de anticuerpos mediante ELISA indirecta

Las muestras se sometieron a análisis mediante un ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), con la finalidad de evaluar la titulación de anticuerpos. Inicialmente se llevó a cabo la sensibilización de los pozos de las placas con la proteína recobinante, utilizando 5µg/mL. Se realizó la dilución de la proteína en buffer de carbonatos y se añadió en los pozos de una placa de poliestireno para realización de la técnica de ELISA. Se realizaron diluciones seriadas de la solución de la proteína tomando 100µL y añadiéndolo a la columna siguiente, una vez finalizados todos los pozos se descartaron los 100µL restantes con el propósito de mantener todos los pozos con idéntica cantidad de microlitros.

El control de conjugado se realizó usando una dilución de suero caprino en buffer de carbonatos, de la cual se utilizaron 100 µL en un pozo libre de sensibilización con la proteína quimérica. Una vez realizada la incubación de las placas sensibilizadas durante 16 horas a 4 °C, se procedió al descarte de la solución presente en los pozos. Posteriormente, para los lavados de la placa se añadieron 200 µl de solución de lavado en cada uno de los pozos de la placa. Este procedimiento se realizó durante tres ocasiones consecutivas. Se añadieron 200 µL de solución de bloqueo en los pozos y posteriormente se envolvieron en película plástica para realizar una incubación a 37 °C con agitación orbital de 200 RPM durante 60 minutos. Una vez finalizada la incubación, se realizaron tres lavados consecutivos de la placa.

Para la detección del antígeno por medio del anticuerpo primario, se diluyó suero perteneciente a cada individuo inmunizado en buffer de fosfatos (1:400). Posteriormente, 100 μ L de la solución fueron añadidos a la placa. A continuación, las placas fueron envueltas en película plástica para su incubación a 37 °C durante 1 hora en agitación orbital a 200 RPM. Una vez finalizada la incubación, se descartó el contenido de la placa para proceder con tres lavados consecutivos de 200 μ L de solución de lavado.

Para la detección del suero bovino utilizado como anticuerpo primario, por medio del anticuerpo secundario, se realizó la dilución de anticuerpos anti IgA 1:6000 y anti IgG 1:400 en buffer de fosfatos. Se agregaron 100 μ L de solución de anticuerpo secundario en todos los pozos en uso. Posteriormente se envolvieron las placas en plástico para realizar incubación en agitación orbital, durante 1 hora a 37°C. Finalmente se realizaron tres lavados consecutivos, agregando a cada placa 200 μ l de buffer de fosfatos. Como último paso, se preparó la solución de revelado (ácido cítrico, citrato de sodio, OPD y peróxido de hidrógeno) midiendo el tiempo a partir del comienzo de su preparación. Se añadieron 100 μ L de solución de revelado en cada pozo utilizado. Una vez alcanzados 15 min y 20 min posteriores a la adición de la solución de revelado, se procedió a la lectura de absorbancia en un lector de placas con filtro de 450 nm agitando las placas lentamente durante 3 segundos (Ausubel et al, 2003; Lin, 2015).

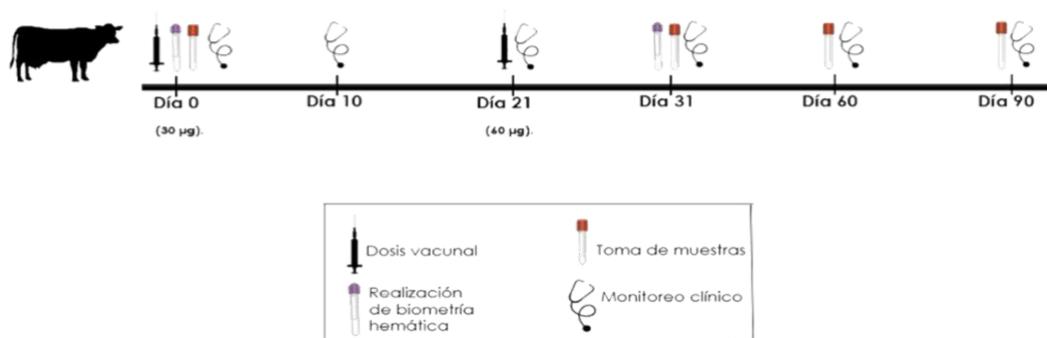


Figura 9. Esquema de inmunización y monitoreo clínico de bovinos

5.7 Análisis estadístico

Los datos se expresaron como la media \pm desviación estándar (DE). Se consideraron seis animales por grupo de experimentación. La evaluación de los títulos de anticuerpos por medio de la técnica de ELISA se realizó por duplicado para cada animal de experimentación de todos los grupos. El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism versión 8.0. para Windows (GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com), con un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) y la prueba post-hoc de Tukey-Kramer para comparaciones múltiples donde las diferencias se consideraron significativas en $p < 0.05$.

VI. RESULTADOS

6.1 Evaluación de la seguridad.

La temperatura de los animales fue monitoreada vía rectal con el mismo termómetro digital (Neutek MT-201C) con la intención de identificar procesos febriles asociados con la vacunación. Antes del inicio del esquema de inmunizaciones, como se puede observar en el **Cuadro 7**, no existió reacción local, ni fiebre. Tampoco se observa diferencia significativa en las variaciones de temperatura del grupo control y tratamiento. Después del monitoreo se administró la primera dosis vacunal de 1mL vía subcutánea en la región cervical lateral izquierda.

Cuadro 7. Monitoreo clínico (Día cero). Temperatura corporal y reacción inflamatoria localizada.

Grupo Control	Temperatura	Reacción local	Grupo Tratamiento	Temperatura	Reacción local
Control 1	37.7 °C	-	Tratamiento 1	37.4 °C	-
Control 2	37.6 °C	-	Tratamiento 2	37.1 °C	-
Control 3	38.0 °C	-	Tratamiento 3	37.6 °C	-
Control 4	38.7 °C	-	Tratamiento 4	38.3 °C	-
Control 5	38.3 °C	-	Tratamiento 5	37.8 °C	-

Control 6	38.5 °C	-	Tratamiento 6	38.0 °C	-
-----------	---------	---	---------------	---------	---

$\bar{X} = 38.1 \text{ °C}$ $\sigma = 0.4$	$\bar{X} = 37.7 \text{ °C}$ $\sigma = 0.38$
---	--

Los resultados del primer día post inmunización (**Cuadro 8**) revelan que ningún individuo presentó proceso febril, y no existe diferencia significativa entre las variaciones de temperatura entre los individuos. A su vez, se realizó el hallazgo de lesiones en el sitio de aplicación en ambos grupos. Estas presentaban consistencia firme a la palpación, misma que generaba reacciones de molestia por parte de los animales. Todos los individuos de los grupos de control y tratamiento presentaron lesiones que iban de los 5.5 cm hasta 15 cm a excepción del animal 1 del grupo al que fue administrada la proteína.

Cuadro 8. Monitoreo clínico (Día 1 postinmunización). Temperatura corporal y reacción inflamatoria localizada.

Grupo Control	Temperatura	Reacción local.	Grupo Tratamiento	Temperatura	Reacción local
Control 1	37.5 °C	6.9 x 15 cm	Tratamiento 1	38.8 °C	No presentó
Control 2	38.6 °C	6 x 8.5 cm	Tratamiento 2	38.5 °C	5.5 x 7.4 cm
Control 3	38.8 °C	5.9 x 6.4 cm	Tratamiento 3	38.6 °C	7.8 x 7 cm
Control 4	38.2 °C	9.3 x 5.5 cm	Tratamiento 4	38.2 °C	8.8 x 5.8 cm
Control 5	38.1 °C	8.5 x 8.5 cm	Tratamiento 5	38.3 °C	12 x 9.5 cm
Control 6	38.8 °C	12 x 8 cm	Tratamiento 6	38.3 °C	8.5 x 8.3 cm

$\bar{X} = 38.3 \text{ °C}$ $\sigma = 0.46$	$\bar{X} = 38.4 \text{ °C}$ $\sigma = 0.23$
--	--

Durante el segundo día después de aplicada la primera dosis vacunal, al ser monitoreada la temperatura corporal de los individuos no existió registro de fiebre en ningún animal, además de no existir diferencia significativa entre las diferentes temperaturas. Las lesiones del sitio de aplicación de manera general presentaron incremento de tamaño como puede apreciarse en el **cuadro 9**, tampoco existieron cambios en su consistencia.

Cuadro 9. Monitoreo clínico (Día 2 postinmunización). Temperatura corporal y reacción inflamatoria localizada.

Grupo Control	Temperatura	Reacción local	Grupo Tratamiento	Temperatura	Reacción local
Control 1	38.0 °C	7 x 18 cm	Tratamiento 1	38.5 °C	18 x 12 cm
Control 2	38.3 °C	5 x 8 cm	Tratamiento 2	38.8 °C	8 x 11 cm
Control 3	38.8 °C	15 x 18 cm	Tratamiento 3	38.8 °C	11 x 11 cm
Control 4	38.2 °C	11 x 9 cm	Tratamiento 4	38.8 °C	14 x 11 cm
Control 5	38.5 °C	6 x 12 cm	Tratamiento 5	39.4 °C	12 x 9.5 cm
Control 6	38.4 °C	14 x 12 cm	Tratamiento 6	38.6 °C	15 x 8 cm

$\bar{X} = 38.3 \text{ °C}$ $\sigma = 0.24$	$\bar{X} = 38.8 \text{ °C}$ $\sigma = 0.28$
--	--

Los resultados del monitoreo del día 10 post inmunización (**Cuadro 10**) revelan la disminución en general del tamaño de las lesiones del sitio de aplicación en ambos grupos. No existió reporte de la presencia de fiebre en ningún individuo, y no hay diferencia significativa entre las temperaturas registradas.

Cuadro 10. Monitoreo clínico (Día 10 postinmunización). Temperatura corporal y reacción inflamatoria localizada.

Grupo Control	Temperatura	Reacción local	Grupo Tratamiento	Temperatura	Reacción local
Control 1	38.3 °C	4 x 5 cm	Tratamiento 1	38.4 °C	1x1 cm
Control 2	38.4 °C	5.5 x 4.5 cm	Tratamiento 2	37.6 °C	5 x 8 cm
Control 3	38.3 °C	6.5 x 7 cm	Tratamiento 3	38.2 °C	6 x 6 cm
Control 4	38.4 °C	6 x 7 cm	Tratamiento 4	38.0 °C	4 x 3 cm
Control 5	38.0 °C	6 x 5 cm	Tratamiento 5	38.5 °C	6 x 7.5 cm
Control 6	38.3 °C	6 x 6.5 cm	Tratamiento 6	38.0 °C	5 x 5 cm

$\bar{X} = 38.2 \text{ °C}$ $\sigma = 0.15$	$\bar{X} = 38.1 \text{ °C}$ $\sigma = 0.29$
--	--

El día 21, fue aplicada la segunda dosis de 1 mL de la vacuna vía subcutánea, en esta ocasión en la región cervical lateral derecha. No existió presencia de fiebre ni hay diferencia significativa entre las temperaturas registradas en los individuos. Las lesiones en el sitio de aplicación de ambos grupos permanecieron del mismo tamaño o decrecieron (**Cuadro 11**).

Cuadro 11. Administración de segunda dosis vacunal y monitoreo clínico (Día 21). Temperatura corporal y reacción inflamatoria localizada.

Grupo Control	Temperatura	Reacción local	Grupo Tratamiento	Temperatura	Reacción local
Control 1	38.4 °C	No presentó	Tratamiento 1	38.0 °C	1 x 1 cm
Control 2	38.2 °C	5 x 5 cm	Tratamiento 2	38.4 °C	1 x 1 cm
Control 3	38.9 °C	5 x 6 cm	Tratamiento 3	38.5 °C	3.5 x 5 cm
Control 4	38.7 °C	5 x 6 cm	Tratamiento 4	38.6 °C	4 x 3 cm
Control 5	38.6 °C	6 x 5 cm	Tratamiento 5	38.6 °C	6.5 x 4 cm
Control 6	38.5 °C	6 x 6 cm	Tratamiento 6	38.8 °C	4 x 4 cm

$\bar{X} = 38.5 \text{ °C}$ $\sigma = 0.22$	$\bar{X} = 38.4 \text{ °C}$ $\sigma = 0.26$
--	--

Al día 22 se observó que todos los individuos del grupo de tratamiento presentaron una reacción similar a la presentada después de la primera dosis. Estas van de 1 a 12 cm con consistencia firme al tacto. Únicamente los animales 1 y 4 del grupo de control presentaron lesión. Al igual que las ocasiones anteriores no hubo presencia de cuadros febriles ni diferencia significativa entre las temperaturas (**Cuadro 12**).

Cuadro 12. Monitoreo clínico (Día 22 postinmunización). Temperatura corporal y reacción inflamatoria localizada.

Grupo Control	Temperatura	Reacción local (I)	Reacción local (D)	Grupo Tratamiento	Temperatura	Reacción local (I)	Reacción local (D)
Control 1	38.2 °C	No presentó	4 x 6 cm	Tratamiento 1	38.2 °C	1 x 1 cm	1 x 1 cm

Control 2	38.4 °C	5 x 5 cm	No presentó	Tratamiento 2	38.4 °C	1 x 1 cm	9 x 5 cm
Control 3	39.1 °C	5 x 6 cm	No presentó	Tratamiento 3	38.8 °C	3.5 x 5 cm	12 x 7.5 cm
Control 4	38.2 °C	5 x 6 cm	10 x 8 cm	Tratamiento 4	38.8 °C	4 x 3 cm	9 x 6 cm
Control 5	38.6 °C	6.5 x 6.5 cm	No presentó	Tratamiento 5	38.9 °C	6.5 x 4 cm	11 x 12 cm
Control 6	38.4 °C	6 x 6 cm	No presentó	Tratamiento 6	38.9°C	4 x 4 cm	7 x 12 cm

$\bar{X} = 38.4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ $\sigma = 0.31$	$\bar{X} = 38.6 \text{ }^{\circ}\text{C}$ $\sigma = 0.27$
--	--

Durante el monitoreo del día 23, se confirmó el crecimiento de las lesiones post vacunales locales, alcanzando hasta 20 cm. No se presentó lesión en ningún otro animal del grupo de control a excepción del animal 1 y 4. No existió reporte de procesos febriles ni de diferencia significativa entre las temperaturas registradas. (**Cuadro 13**)

Cuadro 13. Monitoreo clínico (Día 23 postinmunización) Temperatura corporal y reacción inflamatoria localizada.

Grupo Control	Temperatura	Reacción local (I)	Reacción local (D)	Grupo Tratamiento	Temperatura	Reacción local (I)	Reacción local (D)
Control 1	38.1°C	No presentó	12 x 10 cm	Tratamiento 1	38.5°C	No presentó	No presentó
Control 2	38.3°C	5 x 5 cm	No presentó	Tratamiento 2	38.9°C	1 x 1 cm	20 x 7 cm
Control 3	38.1°C	5 x 5 cm	No presentó	Tratamiento 3	38.8°C	3 x 3 cm	19 x 5 cm
Control 4	38.5°C	5 x 5 cm	8 x 7 cm	Tratamiento 4	38.3°C	4 x 2 cm	18 x 10 cm
Control 5	38.1°C	5 x 6 cm	No presentó	Tratamiento 5	38.6°C	3 x 3 cm	20 x 8 cm

Control 6	38.5°C	4.5 x 4.5 cm	No presentó	Tratamiento 6	38.7°C	4 x 4 cm	13 x 12 cm
-----------	--------	--------------	-------------	---------------	--------	----------	------------

$\bar{X} = 38.2\text{ °C}$ $\sigma = 0.19$	$\bar{X} = 38.6\text{ °C}$ $\sigma = 0.2$
---	--

Para el día 31, el tamaño de las lesiones de ambos grupos se redujo. El animal 6 del grupo de tratamiento presentó ulceración en el sitio de aplicación a pesar de la reducción significativa de tamaño que tuvo la lesión. Este se trata del único caso en el cual se presentó una lesión de tipo ulcerativa. En cuanto a la temperatura registrada, ningún individuo presentó fiebre. (Cuadro 14).

Cuadro 14. Monitoreo clínico (Día 31 postinmunización). Temperatura corporal y reacción inflamatoria localizada.

Grupo Control	Temperatura	Reacción local (I)	Reacción local (D)	Grupo Tratamiento	Temperatura	Reacción local (I)	Reacción local (D)
Control 1	38.0 °C	No presentó	5 x 5 cm	Tratamiento 1	38.6 °C	No presentó	No presentó
Control 2	38.4 °C	4 x 4 cm	No presentó	Tratamiento 2	37.3 °C	No presentó	10 x 7 cm
Control 3	37.8 °C	5 x 5 cm	No presentó	Tratamiento 3	37.7 °C	2 x 2 cm	3 x 3 cm
Control 4	38.0 °C	5 x 5 cm	5 x 5 cm	Tratamiento 4	37.5 °C	4 x 2 cm	5 x 6 cm
Control 5	37.9°C	5 x 6 cm	No presentó	Tratamiento 5	38.9 °C	3 x 3 cm	4 x 5 cm
Control 6	38.5°C	4.5 x 4.5 cm	No presentó	Tratamiento 6	39.0 °C	4 x 4 cm	5.5 x 6 cm Ulceración en sitio de aplicación

$\bar{X} = 38.1\text{ °C}$ $\sigma = 0.25$	$\bar{X} = 38.1\text{ °C}$ $\sigma = 0.69$
---	---

Al día 60, las lesiones continuaron decreciendo en ambos grupos. Las lesiones generadas después de la primera dosis desaparecieron casi en su totalidad en el grupo de tratamiento,

persistiendo únicamente en el animal 3 y 5. En el grupo de control las lesiones siguieron siendo perceptibles hasta el término del experimento. La lesión ulcerativa del animal 6 del grupo de tratamiento evolucionó hasta ser perceptibles únicamente remanentes de esta. No existió evidencia de procesos febriles en ningún individuo. (**Cuadro 15**)

Cuadro 15. Monitoreo clínico (Día 60 postinmunización). Temperatura corporal y reacción inflamatoria localizada.

Grupo control	Temperatura	Reacción local (I)	Reacción local (D)	Grupo Tratamiento	Temperatura	Reacción local (I)	Reacción local (D)
Control 1	38.3 °C	No presentó	5 x 4 cm	Tratamiento 1	38.4 °C	No presentó	No presentó
Control 2	38.3 °C	3.5 x 4 cm	No presentó	Tratamiento 2	38.4 °C	No presentó	5 x 3 cm
Control 3	38.6 °C	3 x 4 cm	No presentó	Tratamiento 3	38.5 °C	2 x 2 cm	2.5 x 3 cm
Control 4	38.0 °C	5 x 5 cm	5 x 5 cm	Tratamiento 4	38.2 °C	No presentó	3 x 4 cm
Control 5	38.9 °C	5 x 6 cm	No presentó	Tratamiento 5	38.2 °C	3 x 3 cm	4 x 4 cm
Control 6	38.2 °C	4.5 x 4.5 cm	No presentó	Tratamiento 6	38.9 °C	No presentó	4 x 6 cm Remanentes de ulceración en sitio de aplicación lado derecho

$\bar{X} = 38.3 \text{ °C}$ $\sigma = 0.3$	$\bar{X} = 38.4 \text{ °C}$ $\sigma = 0.23$
---	--

En el último monitoreo realizado se confirmó la ausencia del individuo 1 del grupo de control quien sufrió una fractura dentro de los corrales y fue enviado a rastro. Las lesiones de ambos lados de la región cervical continuaron reduciéndose, desapareciendo en algunos individuos. Las temperaturas registradas en todos los individuos se encuentran dentro del rango normal de la especie (**Cuadro 16**)

Cuadro 16. Monitoreo clínico (Día 90 postinmunización). Temperatura corporal y reacción inflamatoria localizada.

Grupo Control	Temperatura	Reacción local (I)	Reacción local (D)	Grupo Tratamiento	Temperatura	Reacción local (I)	Reacción local (D)
Control 1	-	-	-	Tratamiento 1	38.2 °C	No presentó	No presentó
Control 2	37.8 °C	No presentó	No presentó	Tratamiento 2	38.2 °C	No presentó	2 x 2 cm
Control 3	38.1 °C	3 x 4 cm	No presentó	Tratamiento 3	38.1 °C	2 x 2 cm	No presentó
Control 4	38.1 °C	5 x 5 cm	No presentó	Tratamiento 4	38.1 °C	No presentó	1 x 1 cm
Control 5	38.3 °C	3 x 6 cm	No presentó	Tratamiento 5	37.2 °C	3 x 3 cm	2 x 2 cm
Control 6	38.2 °C	4 x 4.5 cm	No presentó	Tratamiento 6	38.1 °C	No presentó	No presentó

$\bar{X} = 38.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\sigma = 0.15$	$\bar{X} = 37.9\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\sigma = 0.36$
---	---

6.2 Hemogramas.

6.2.1 Eritrograma preinmunización.

Tanto los individuos del grupo de control como de tratamiento presentaron alteraciones en el eritrograma practicado previo a la inmunización. En el grupo control, el animal 1 presentó elevación en los niveles normales del hematocrito y hemoglobina. Por su parte los animales 2, 3, 4 y 6 presentaron elevación en el conteo plaquetario y el animal 5 presentó una ligera elevación en los niveles de hemoglobina.

En lo que respecta a los individuos pertenecientes al grupo de tratamiento, el animal 2 presentó una elevación ligera en los niveles de hematocrito y plaquetas. De igual manera, una elevación ligera de hematocrito y hemoglobina se presentó en el animal 4 (**Cuadro 17**).

Cuadro 17. Eritrograma practicado a los bovinos de los grupos control y tratamiento, previos a la exposición con el antígeno vacunal. Los valores elevados fuera de los rangos fisiológicos son expresados con negritas (Valores de referencia: Schalm, 2010).

Grupo Control	Hematocrito (25.0-42.0%)	Hemoglobina (8.0-14.0 g/dL)	Concentración de hemoglobina corpuscular media (27.0- 34.9 g/dL)	Plaquetas (175- 500 x 10 ⁹ /L)
Control 1	47.7 %	15.4 g/dL	32.3 g/dL	95 x 10 ⁹ /L
Control 2	40.4 %	13.5 g/dL	33.4 g/dL	573 x 10 ⁹ /L
Control 3	35.9 %	12.3 g/dL	34.3 g/dL	533 x 10 ⁹ /L
Control 4	40.3 %	13.6 g/dL	33.7 g/dL	523 x 10 ⁹ /L
Control 5	50 %	14.2 g/dL	28.4 g/dL	434 x 10 ⁹ /L
Control 6	36.7 %	12.0 g/dL	32.7 g/dL	595 x 10 ⁹ /L

Grupo Tratamiento	Hematocrito (25.0- 42.0%)	Hemoglobina (8.0-14.0 g/dL)	Concentración de hemoglobina corpuscular media (27.0-34.9 g/dL)	Plaquetas (175-500 x 10 ⁹ /L)
Tratamiento 1	37.6 %	12.4 g/dL	33.0 g/dL	472 x 10 ⁹ /L
Tratamiento 2	42.2 %	11.6 g/dL	-	562 x 10 ⁹ /L
Tratamiento 3	37.1 %	13.1 g/dL	35.3 g/dL	440 x 10 ⁹ /L
Tratamiento 4	42.8%	14.7 g/dL	34.3 g/dL	452 x 10 ⁹ /L
Tratamiento 5	32.5 %	11.3 g/dL	34.8 g/dL	410 x 10 ⁹ /L
Tratamiento 6	32.8 %	11.2 g/dL	34.1 g/dL	486 x 10 ⁹ /L

6.2.2 Eritrograma post inmunización.

El eritrograma realizado 30 días posteriores a la primovacunación reveló alteraciones en ambos grupos. En el grupo control, los resultados revelaron aún más elevación de los niveles de plaquetas en los individuos 2, 3 y 6 siendo consistente la trombocitosis presentada previo al inicio del esquema de inmunización. Por su parte, el animal 4 que también mostró niveles elevados de plaquetas en el primer eritrograma, regularizó sus valores, pero mostró elevación en los niveles de hematocrito y hemoglobina. De igual manera, se restablecieron dentro del rango normal los valores de hematocrito y conteo de hemoglobina del animal 1 que durante el primer eritrograma se vieron aumentados.

En el grupo de tratamiento, los valores de plaquetas de los individuos 1, 2, 3, 4 y 5 se vieron aumentados. El animal 2 mantuvo el conteo de hemoglobina elevado desde el primer eritrograma; sin embargo, los niveles de plaquetas disminuyeron, aunque permanecieron sobre el rango normal (**Cuadro 18**).

Cuadro 18. Eritrograma practicado a los bovinos de los grupos control y tratamiento, posterior a la exposición con el antígeno vacunal. Los valores elevados fuera de los rangos fisiológicos son expresados con negritas (Valores de referencia: Schalm, 2010).

Grupo Control	Hematocrito (25.0-42.0%)	Hemoglobina (8.0-14.0 g/dL)	Concentración de hemoglobina corpuscular media (27.0- 34.9 g/dL)	Plaquetas (175- 500 x 10 ⁹ /L)
Control 1	39.3 %	13.6 g/dL	34.6 g/dL	456 x 10 ⁹ /L
Control 2	39.8 %	12.8 g/dL	32.2 g/dL	699 x 10⁹/L
Control 3	35.2 %	12.4 g/dL	35.2 g/dL	675 x 10⁹/L
Control 4	43.4 %	14.4 g/dL	33.2 g/dL	489 x 10 ⁹ /L
Control 5	39.4 %	13.6 g/dL	34.5 g/dL	518 x 10 ⁹ /L
Control 6	37.8 %	12.0 g/dL	31.7 g/dL	659 x 10⁹/L

Grupo Tratamiento	Hematocrito (25.0- 42.0%)	Hemoglobina (8.0-14.0 g/dL)	Concentración de hemoglobina corpuscular media (27.0-34.9 g/dL)	Plaquetas (175-500 x 10 ⁹ /L)
Tratamiento 1	38.3 %	12.9 g/dL	33.7 g/dL	588 x 10 ⁹ /L
Tratamiento 2	41.1 %	14.2 g/dL	34.5 g/dL	526 x 10⁹/L
Tratamiento 3	37.9 %	13.4 g/dL	35.4 g/dL	599 x 10⁹/L
Tratamiento 4	37.1 %	12.6 g/dL	34.0 g/dL	559 x 10⁹/L
Tratamiento 5	34.4 %	11.8 g/dL	34.3 g/dL	741 x 10⁹/L
Tratamiento 6	27.2 %	9.4 g/dL	34.6 g/dL	456 x 10 ⁹ /L

6.2.3 Leucograma preinmunización.

En el conteo celular previo a la inmunización, algunos individuos muestran alteraciones de la línea blanca. Los animales del grupo de control, 1, 2, 4 y 6 revelan la presencia de neutrofilia y en el caso de los animales 5 y 6 se presenta a la par linfocitosis. En el caso concreto del animal 6 cursa además por una monocitosis leve. En cuanto a los animales del grupo de tratamiento, todos presentan linfocitosis. Los animales 1, 3, 4 y 5 presentan su conteo de neutrófilos segmentados elevado; y los individuos 1, 3 y 5 muestran conteos elevados de monocitos (**Cuadro 19**).

Cuadro 19. Leucograma practicado a los bovinos de los grupos control y tratamiento, previos a la exposición con el antígeno vacunal. Los valores elevados fuera de los rangos fisiológicos son expresados con negritas (Valores de referencia: Schalm, 2010).

Grupo Control	Conteo total de leucocitos	Basófilos (<0.1)	Eosinófilos (1.3±0.1)	Neut. Segm. (2.2±0.9)	Neut. Banda (<0.1)	Linfocitos (5.3±1.2)	Monocitos (0.5±0.2)
Control 1	7.1 x 10 ⁹ /L	0	0.14	2.34	0	4.0	0.56
Control 2	11.8 x 10 ⁹ /L	0	0.59	5.54	0	4.83	0.82
Control 3	5.8 x 10 ⁹ /L	0	0.29	1.27	0	3.94	0.29
Control 4	5.9 x 10 ⁹ /L	0	0.59	1.18	0	3.77	0.35
Control 5	12.3 x 10 ⁹ /L	0	0.49	4.0	0	7.62	0.12
Control 6	30.2 x 10 ⁹ /L	0	0.30	7.24	0	21.44	1.20

Grupo Tratamiento	Conteo total de leucocitos	Basófilos (<0.1)	Eosinófilos (1.3±0.1)	Neut. Segm. (2.2±0.9)	Neut. Banda (<0.1)	Linfocitos (5.3±1.2)	Monocitos (0.5±0.2)
Tratamiento 1	36.8 x 10 ⁹ /L	0	0	5.15	0	30.91	0.73
Tratamiento 2	8.1 x 10 ⁹ /L	0	0.16	1.94	0.08	5.42	0.48
Tratamiento 3	13 x 10 ⁹ /L	0	0.26	4.16	0	7.8	0.78
Tratamiento 4	12 x 10 ⁹ /L	0	0.36	3.6	0	7.56	0.48
Tratamiento 5	25.6 x 10 ⁹ /L	0	0.76	3.32	0	19.96	1.53
Tratamiento 6	10.6 x 10 ⁹ /L	0	1.59	2.0	0	6.0	0.95

6.2.4 Leucograma post inmunización.

Los resultados del leucograma realizado 30 días después de la primera exposición al antígeno vacunal revelaron valores la persistencia de neutrofilia en los animales 1, 2, 4 y 6 añadiendo también el animal 3 y 5 al conteo elevado de neutrófilos entre los animales del grupo de control; sin embargo en esta ocasión se hace evidente la elevación del conteo de bandas en todos los individuos. La linfocitosis persiste en el individuo 6 y el bovino 5 restableció sus valores dentro de los rangos fisiológicos; sin embargo, el bovino 4 presentó elevación en su conteo linfocitario además de monocitosis.

En cuanto a los animales del grupo inmunizado todos presentaron neutrofilia a excepción del individuo 6. Las bandas se vieron aumentadas únicamente en los animales 3 y 6. Todos los individuos manifestaron linfocitosis a excepción del animal 6 quien restableció sus valores. El individuo 1 continúa con monocitosis teniendo una ligera elevación, y el individuo 6 también vio superados sus valores monocíticos (**Cuadro 20**).

Cuadro 20. Leucograma practicado a los bovinos de los grupos control y tratamiento, posteriores a la exposición con el antígeno vacunal. Los valores elevados fuera de los rangos fisiológicos son expresados con negritas (Valores de referencia: Schalm, 2010).

Grupo Control	Conteo total de leucocitos	Basófilos (<0.1)	Eosinófilos (1.3±0.1)	Neut. Segm. (2.2±0.9)	Neut. Banda (<0.1)	Linfocitos (5.3±1.2)	Monocitos (0.5±0.2)
Control 1	9.8 x 10 ⁹ / L	0	0.19	4.21	0.39	4.60	0.39
Control 2	8.8 x 10 ⁹ / L	0	0.44	3.96	0.44	3.69	0.26
Control 3	7.1 x 10 ⁹ / L	0	0.21	2.34	0.63	3.76	0.14
Control 4	19.8 x 10 ⁹ / L	0	1.18	6.73	1.78	9.30	0.79
Control 5	10 x 10 ⁹ / L	0	0.2	4.3	0.4	4.7	0.4
Control 6	22.3 x 10 ⁹ / L	0	0	3.3	0.22	18.28	0.44

Grupo Tratamiento	Conteo total de leucocitos	Basófilos (<0.1)	Eosinófilos (1.3±0.1)	Neut. Segm. (2.2±0.9)	Neut. Banda (<0.1)	Linfocitos (5.3±1.2)	Monocitos (0.5±0.2)
Tratamiento 1	31.3 x 10 ⁹ / L	0	0.31	7.82	0	21.91	1.25
Tratamiento 2	16.6 x 10 ⁹ / L	0	0.99	2.82	0	12.61	0.16
Tratamiento 3	10.7 x 10 ⁹ / L	0	0.21	4.06	0.32	5.77	0.32
Tratamiento 4	9.7 x 10 ⁹ / L	0	0.58	3.29	.09	5.43	0.29
Tratamiento 5	15.4 x 10 ⁹ / L	0	0.15	3.54	0	11.70	0
Tratamiento 6	7.1 x 10 ⁹ / L	0	0.14	1.98	0.35	3.90	0.71

6.3 Sensibilización de placas

Para la estandarización de la técnica de ELISA que se usó en la identificación de anticuerpos en leche y suero, fue necesario encontrar la concentración ideal de antígeno (Quivax) requerida para la sensibilización de las placas y que fuera la concentración ideal donde se pudieran ser observados claramente los resultados entre sus grupos control y tratamiento.

Se inició sensibilizando las placas de ELISA con cuatro concentraciones de Quivax (1.75, 2.5, 5 y 10 µg/ mL) y se probaron sueros de animales pre y post inmunización (Día 31).

Como se puede observar en la Figura 9. Se graficaron las densidades ópticas para las concentraciones de IgG en sueros de animales a una concentración de 1:200 Una diferencia significativa es evidente entre las concentraciones de IgG de los animales inmunizados y no inmunizados para los pozos sensibilizados con 5 µg/ mL.

Por esta razón se decidió sensibilizar todas las placas para la detección de títulos de anticuerpos IgG en sueros con 5 µg/ mL (**Figura 10**)

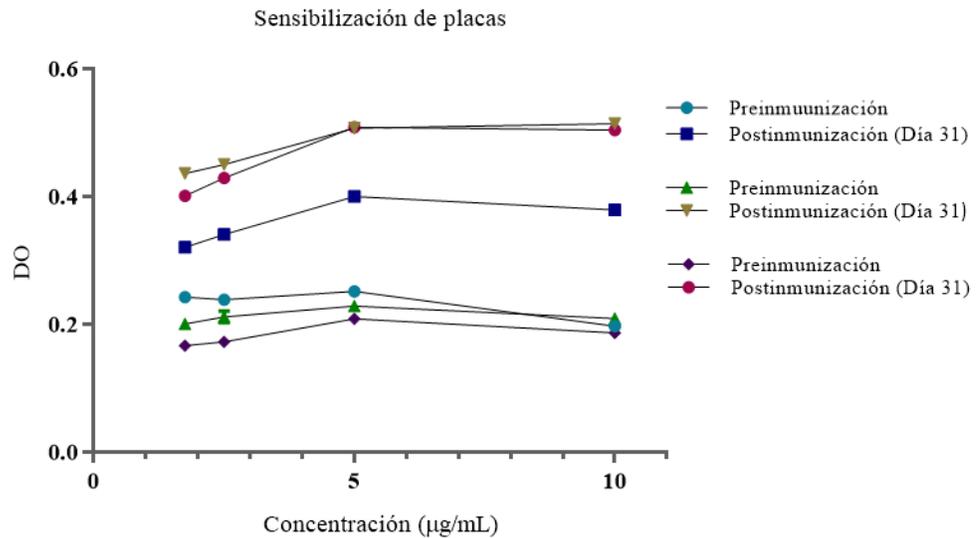


Figura 10. Gráfica de evaluación de la concentración de antígeno ideal para forrar las placas de ELISA.

6.4 Títulos de anticuerpos en suero

La medición de anticuerpos IgG totales en suero se realizó por medio de la técnica de ELISA indirecta, en la que se llevaron a cabo diferentes diluciones (1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400, 1:12800, 1:25600 y 1:51200) de los sueros pre inmunes y de los días 31, 60 y 90 post inmunización. Se determinó que la dilución con la concentración óptima sería 1:800 debido a que la densidad óptica presentada fue mayor a 0.6.

A partir de la dilución 1:800 se observa la mayor diferencia significativa entre las DO de los sueros del grupo de animales inmunizados y de control. Los sueros preinmunes (Día 0) del grupo de control mostraron una DO=0.094, al día 31 (DO= 0.051), día 60 (DO=0.061) y día 90 (DO= 0.060), en contraste con el grupo inmunizado que presentó al día 0 una (DO= 0.18), al día 31 presentaron una (DO=0.54), al día 60 (DO=0.59) y al día 90 (DO=0.56). La mayor diferencia se refleja entre las DO del día 31 del grupo de control (DO= 0.051) y el día 60 del grupo inmunizado (DO=0.59) con lo que es posible concluir que no existió generación de anticuerpos en los sueros preinmunes ni en el grupo de control.

Fue a partir de la dilución 1:25600 que se observó la menor diferencia estadística entre las DO de todos los sueros de los animales del grupo de control: día 0 (DO= 0.096), día 31, (DO= 0.06), día 60 (DO= 0.076) y día 90 (DO= 0.06); y las DO del grupo de animales inmunizados en los que se observan los siguientes valores: días 0 (DO=0.10), 31 (DO=0.10), 60 (DO= 0.20) y 90 (DO= 0.18).

Siempre existió una tendencia mayor de DO en las diluciones realizadas a los sueros del día 60 del grupo inmunizado (**Figura 11**).

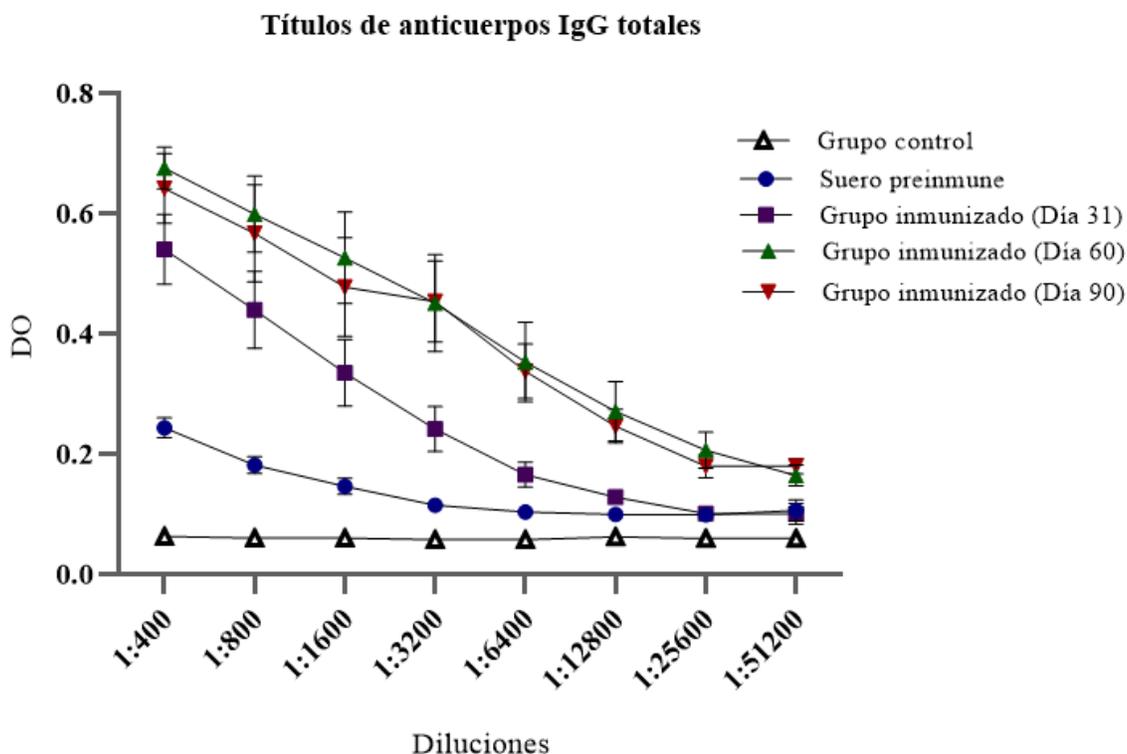


Figura 11. Determinación de los títulos de anticuerpos IgG.

La figura 12 muestra la concentración de anticuerpos totales IgG durante el tiempo del esquema de inmunizaciones con sueros preinmunes hasta el día 90 postinmunización comenzando con una densidad óptica de 0.19 para el grupo de control y 0.2 para el grupo inmunizado. A partir del día 31 postinmunización, la DO del grupo inmunizado comienza a elevarse, separándose de la línea que indica la DO del grupo de control. Al día 60 se observa la elevación de la línea de control (DO=0.2) junto con la de los animales inmunizados (DO=0.29). A partir de este punto la línea de control desciende su DO=0.28 a 0.20 hacia el día 90 y la del grupo de tratamiento continúa con tendencia creciente con DO=0.44 a 0.47 al día 90. La mayor concentración de anticuerpos IgG en el suero de los bovinos inmunizados fue identificada en el día 90 postinmunización con una densidad óptica de 0.47. Los sueros fueron usados en una concentración de 1:800 para la realización de la técnica (**Figura 12**)

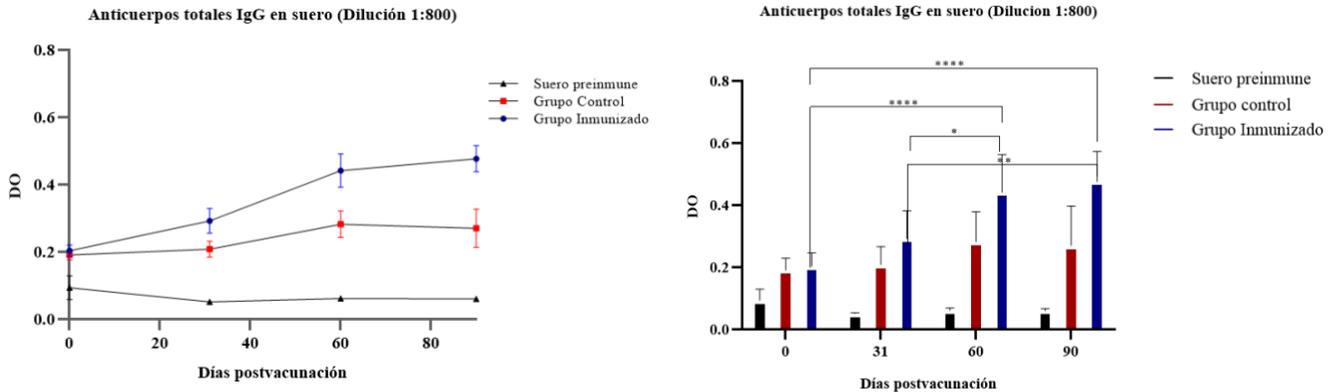


Figura 12. Gráfica de la evaluación de la respuesta de anticuerpos IgG totales presentes en suero.

Para determinar la presencia de anticuerpos IgA en el suero de los bovinos inmunizados se usó una concentración de 1:400. La gráfica comienza con una DO= 0.09 para el grupo control y de DO= 0.121 para el grupo inmunizado. En el día 31 postinmunización los valores de DO de ambos grupos descienden a DO= 0.07 para el grupo control y el grupo inmunizado bajó hasta DO= 0.103. Hacia el día 60, se registró un ligero aumento en ambos grupos con Do= 0.09 para el grupo control y DO=0.127 para el grupo de tratamiento. Finalmente al día 90 se alcanzaron valores de 0.13 para ambos grupos (**Figura 13**)

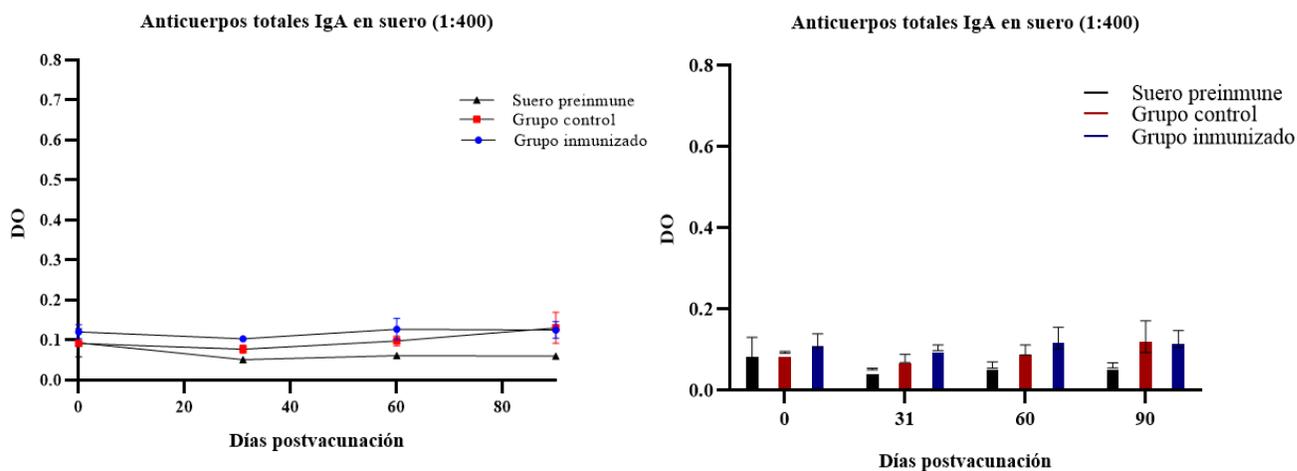


Figura 13. Gráfica de la evaluación de la respuesta de anticuerpos totales IgA presentes en suero con dilución 1:400

La determinación de la presencia de anticuerpos de isotipo IgG en leche fue realizado usando una concentración de 1:400, en la que se utilizaron sueros de ambos grupos. La gráfica comienza con una DO= 0.08 para el grupo de control y de DO= 0.18 para el grupo de animales inmunizados; sin embargo, para el día 10 la densidad óptica de ambos grupos descendió hasta DO= 0.06. Por su parte, al día 31 ambos grupos vieron su densidad óptica elevada, control con DO=0.089 y el de tratamiento DO= 0.12. Finalmente al día 60 los valores de la densidad óptica para el grupo de control subió ligeramente a DO= 0.089 y a de los animales inmunizados bajó a DO= 0.068 (**Figura 14**).

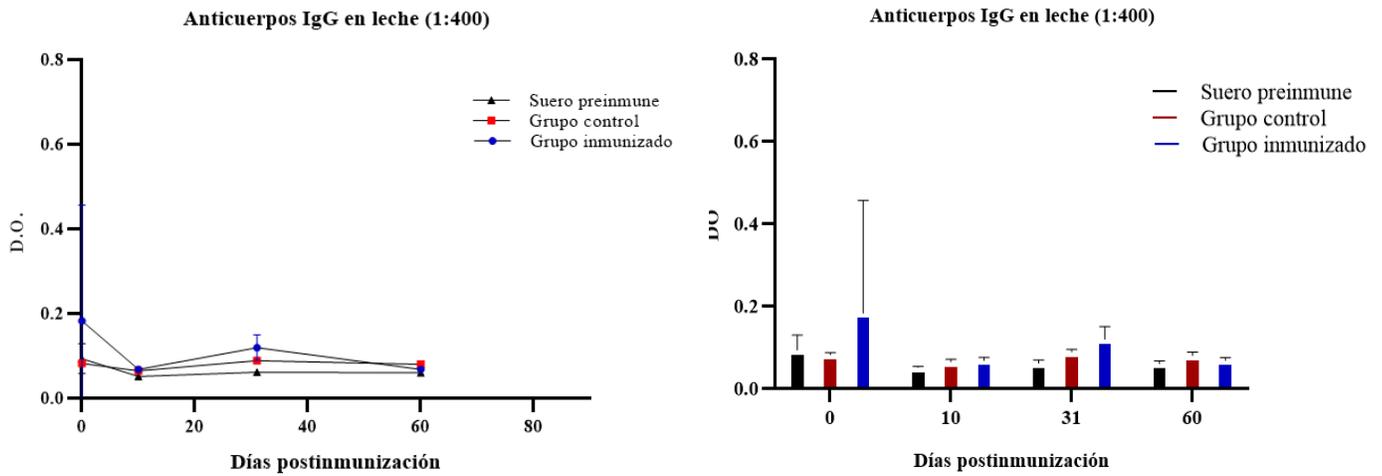


Figura 14. Gráfica de la evaluación de la respuesta de anticuerpos totales IgG en leche.

Por su parte, para la concentración de 1:400, la gráfica comienza con una DO de 0.080 para el grupo control y 0.066 para el grupo inmunizado. Diez días posteriores a la primovacunación los valores de la DO descienden para ambos grupos a 0.063, para posteriormente al día 31 verse elevados de nuevo con 0.085 para el grupo control y 0.010 para el grupo inmunizado. Finalmente el día 60, los valores de ambos grupos sufren un descenso de 0.076 para el grupo control y 0.064 para el de tratamiento (**Figura 15**)

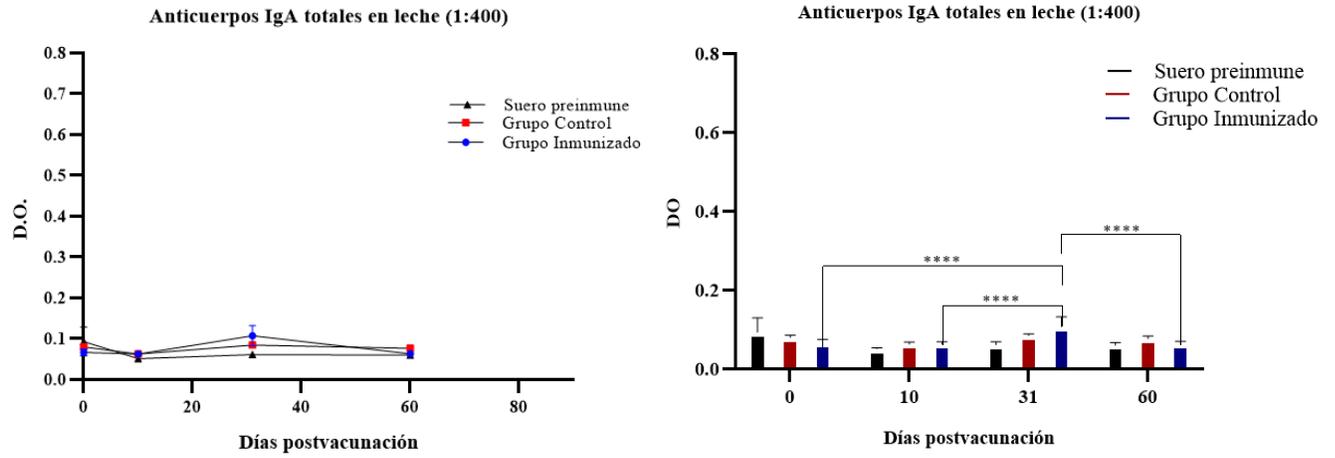


Figura 15. Gráfica de la evaluación de la respuesta de anticuerpos IgA en leche dilución 1:400.

VII. DISCUSIÓN.

Como parte del estudio preclínico del desarrollo de la vacuna QUIVAX 17.4, se han inoculado dos dosis vacunales de 100 µg y de 60 µg, monitoreando dos aspectos clave en la evaluación preclínica que son el estudio de la inmunogenicidad de la proteína; y el análisis de las las reacciones secundarias posteriores a la primer y segunda inmunización relacionada con cada una de las diferentes concentraciones.

Se realizó la evaluación del sitio de inoculación de la vacuna para confirmar o descartar la presencia de lesiones o reacciones locales. Después de la primera inmunización con 100 µg todos los individuos pertenecientes a ambos grupos, a excepción de un individuo del grupo de tratamiento, presentaron lesiones en la región cervical lateral izquierda presentando nódulos subcutáneos de consistencia firme cuyo tamaño se vio incrementado durante los primeros días y fueron decreciendo hacia el día 21 post vacunación, mismo día en que fue aplicada la segunda dosis de 60 µg de antígeno. Posteriormente, se presentaron lesiones de apariencia y consistencia similares a las reportadas después de la primera dosis en los animales del grupo de tratamiento y dos del grupo control, esta vez en la región cervical lateral derecha. El tamaño de las lesiones se vio aumentado los primeros días e involucionaron hacia el día 90 post inmunización. Únicamente un individuo del grupo de tratamiento presentó ulceración en el sitio de aplicación que se resolvió sin complicaciones.

El adyuvante utilizado en el presente estudio, Montanide™ 71 VG (Seppic, París, Francia), se trata de una emulsión agua-aceite, formulada a base de aceite mineral y un emulsificador de manitol- ácido oleico altamente refinado que estimula la respuesta Th1 mediada por células (Jang et al, 2013) así como la producción de anticuerpos IgG2 (Klimka et al, 2015). Se ha reportado la eficacia de dicho adyuvante en el mejoramiento de inmunidad protectora contra diversas enfermedades de importancia veterinaria cuando se usa en conjunto con proteínas recombinantes de distintos agentes infecciosos parasitarios, virales o bacterianos (Jang et al, 2011), a pesar de que el antígeno usado presente baja inmunogenicidad por sí mismo. Este ha sido usado de manera exitosa en diferentes especies como aves, bovinos y pequeños rumiantes (Jang et al, 2013).

Existen otros adyuvantes como el adyuvante de Freund que ha sido considerado como uno de los más eficaces dado a su capacidad de estimular niveles elevados de inmunidad a largo plazo; sin embargo actualmente ha sido desplazado en su uso para investigación y no posee autorización de los organismos regulatorios para su uso en animales ni humanos debido a las fuertes reacciones secundarias que se presentan después de su inoculación (Klimka et al, 2015; Sharma & Hinds, 2012). Por tal motivo se optó por el uso de un adyuvante de emulsión agua-aceite con la finalidad de aumentar la seguridad de la vacuna evitando en lo posible la aparición de reacciones adversas post inoculación; sin embargo se esperaban reacciones inflamatorias locales leves inducidas tanto por la reacción al antígeno como al adyuvante como lo describen Sellon & Long (2013) y Tizard (2018), donde reportan la posible generación de reacciones adversas sistémicas como fiebre y anorexia, ambas inexistentes en los individuos del estudio; y reacciones locales como inflamación, y la formación de granulomas o abscesos.

Pueden existir otras causas para las reacciones presentadas como: la presencia de contaminación bacteriana en las jeringas o en el sitio de aplicación, microorganismos vivos en la vacuna, y reacciones de hipersensibilidad (Roth, 1999).

Entre los criterios para considerar efectivo un adyuvante de emulsión son una baja viscosidad, alta estabilidad, liberación lenta de antígenos a partir del sitio de aplicación, generación de procesos inflamatorios leves que promueven el reclutamiento de células presentadoras de antígeno para la liberación de citocinas estimulantes de la inmunidad celular y humoral (Klimka et al, 2015). Al tener un efecto de depósito, el adyuvante conduce a la liberación lenta del antígeno en el sitio de la aplicación y puede provocar un proceso inflamatorio leve que estimula el reclutamiento de células presentadoras de antígeno como macrófagos y células dendríticas (Klimka et al, 2015), lo cual explica la presencia de los nódulos previamente descritos en el sitio de aplicación. No se llevaron a cabo estudios histopatológicos de las lesiones; sin embargo se hipotetiza que se trata de un proceso inflamatorio activo provocado por la inoculación de la emulsión vacunal compuesta por el adyuvante y la proteína. Como se mencionó anteriormente, el efecto de depósito pudo ser evidenciado mediante el tiempo de permanencia de la lesión en el sitio de aplicación, según lo afirma, tiempo en el que se llevó a cabo el reclutamiento de células inflamatorias e inmunitarias y el antígeno fue liberado lentamente mientras la lesión involuccionaba (Klimka et al, 2015).

Posterior a la primera inmunización con 100 µg ambos grupos presentaron reacción en el sitio de aplicación; sin embargo, después de la segunda dosis esta vez de 60 µg, el grupo de control presentó poca reactividad a la inoculación de adyuvante, donde únicamente dos animales presentaron reacción leve. No así el grupo inmunizado en el cual todos los individuos presentaron de nuevo reacción inflamatoria incluso al reducir la concentración de antígeno en la vacuna.

Todos los individuos pertenecientes al grupo de control y tratamiento registraron una temperatura corporal normal dentro de los rangos fisiológicos de la especie, mismos que oscilan entre los 37.7°C a 39.2.0°C (UNAM, s.f.; University of Glasgow; s.f.). La temperatura fue monitoreada durante la misma hora y previo al resto de procedimientos y manejo realizados para el experimento con la finalidad de evitar alteraciones de la misma, se concluye que no existió ninguna reacción febril en ninguno de los individuos de ambos grupos.

La evaluación sanguínea mediante hemograma es un componente esencial para el diagnóstico, monitoreo y pronóstico de una enfermedad. (Schalm, 2010). Los hemogramas practicados a los individuos objetos del estudio, revelan algunas alteraciones. En el eritrograma de los individuos de control, el bovino 1 presenta elevación del hematocrito y la hemoglobina (al igual que el individuo 5), lo que podría ser un indicador de eritrocitosis e indicar un posible proceso de deshidratación tratándose de una policitemia relativa. También pudo deberse a una policitemia absoluta asociada a anomalías en el control de precursores eritrocíticos en médula ósea, o a una lesión o proceso neoplásico renal que afecte el

funcionamiento de las células secretoras de eritropoyetina; o en estados de hipoxia (Schalm, 2010; Trigo, 2023).

Los individuos 2, 3, 4 y 6 presentaron trombocitosis, esta puede deberse a la presencia de artefactos eritrocitarios conocido como pseudo trombocitosis, alteraciones en la movilización de plaquetas por excitación, posterior a un proceso de esplenectomía, a un proceso inflamatorio; iatrogénica por el uso de fármacos como sulfato de vincristina; o debida a la deficiencia en la generación de las mismas como la presencia de neoplasias relacionadas con los megacariocito y algunos tipos de leucemias (Schalm, 2010).

En cuanto al eritrograma preinmune del grupo inmunizado se revela únicamente la elevación del conteo de hematocrito y plaquetas en el animal 2 y hematocrito y hemoglobina en el individuo 4 cuyas posibles causas han sido explicadas en el párrafo anterior.

Por su parte el eritrograma post inmunización del grupo de control muestra una mayor elevación en el conteo plaquetario de los animales 2, 3 y 6. Los valores de plaquetas del animal 4 volvieron dentro de rango pero esta vez la hemoglobina y hematocrito se vieron aumentados. En el grupo inmunizado se elevaron los valores plaquetarios de los individuos 1,2,3,4 y 5; así como el animal 2 mantuvo un conteo elevado de hemoglobina desde el primer hemograma practicado.

Se hipotetiza como posible causa de elevación del hematocrito y hemoglobina una eritrocitosis relativa a causa de un posible proceso de deshidratación. Por su parte los conteos elevados de plaquetas en los hemogramas pre inmunes podrían deberse al estrés generado en los animales por el manejo, en el hemograma post inmunización se podría sospechar de reactividad inflamatoria, sin descartar la posibilidad de un proceso neoplásico (Schalm, 2010).

En lo que respecta al leucograma pre inmunización del grupo de control, se evidencian alteraciones donde se aprecia un proceso de neutrofilia en los individuos 1, 2, 5 y 6. En los animales 5 y 6 se presentó linfocitosis y en este último también se hizo evidente un conteo elevado de monocitos. Según Schalm (2010) la neutrofilia puede estar relacionada con el efecto producido por glucocorticoides exógenos o endógenos. Al momento de realizar el experimento, los animales no se encontraban bajo ningún tipo de tratamiento, por lo que la posibilidad de la alteración por glucocorticoides queda relegada a la elevación de los mismos de manera endógena probablemente inducidos por estrés; sin embargo, el leucograma por estrés suele reportar además de neutrofilia, linfopenia y eosinopenia.

Otra causa importante de elevación de conteo de neutrófilos en sangre es el curso de un proceso inflamatorio agudo, en bovinos suele ocurrir neutropenia en las primeras 24 - 48 hrs debido al reclutamiento de neutrófilos en el sitio de lesión y a la lenta movilización de colonias de células madre en contraste con otras especies. Pasadas las 24 horas pueden verse desviación a la izquierda con elevación de neutrófilos inmaduros como bandas y metamielocitos lo que se asocia con un pronóstico reservado en la mayoría de las especies. Sin embargo, pasados 3 a 5 días el número de neutrófilos puede verse elevado de nuevo junto al número de neutrófilos inmaduros, lo que resulta en neutrofilia. De igual manera un proceso

inflamatorio crónico podría generar un proceso de neutrofilia, por lo que el mejor indicador diagnóstico en estos casos es la hiperfibrinogenemia (Schalm, 2010).

Entre otras causas probables de neutrofilia está la presencia de neoplasias, desplazamiento abomasal, toxicosis, anemia inmunomediada, ARDS y debido a iatrogenia por el tratamiento con somatotropina (Schalm, 2010), la mayoría de las cuales podrían descartarse en los individuos de estudio, a excepción quizá de la presencia de alguna neoplasia.

En el caso de los bovinos del hemograma preinmune con neutrofilia, es probable que estuvieran cursando por alguna infección o algún proceso inflamatorio que indujera la elevación de neutrófilos, como algún trastorno gastroentérico, mastitis o algún proceso viral, bacteriano o parasitario; sin embargo no se descarta la posibilidad de la neutropenia inducida por liberación de corticosteroides endógenos.

Los individuos 5 y 6 además de neutrofilia, presentaron linfocitosis. Este hallazgo no es muy común en bovinos y podría deberse a infecciones virales crónicas, tripanosomiasis crónica, e inflamación crónica, la liberación de epinefrina, así como la presencia de leucemia linfocítica. Un agente a considerar sería el virus de la leucemia viral bovina (BLV) que provoca linfocitosis persistente (Schalm, 2010).

Por su parte la monocitosis presentada por el individuo 6 además de la neutrofilia y linfocitosis podría estar relacionada con respuesta al estrés, así como parte de la respuesta inflamatoria (Schalm, 2010).

En el leucograma preinmune del grupo de tratamiento se evidencia neutrofilia en los individuos 1, 3, 4 y 5; y linfocitosis en todos los individuos. Se presenta también en los bovinos 1, 3 y 5 monocitosis lo que podría ser consistente con un proceso inflamatorio o parte de un proceso infeccioso (Schalm, 2010).

En el hemograma practicado 10 días después de la segunda inmunización al grupo de control revela la persistencia de neutrofilia en los animales 1, 2, 4 y 6; además el conteo de neutrófilos de los animales 3 y 5 también sufrió elevación; así como el conteo de neutrófilos inmaduros (bandas) en todos los individuos se vio elevado, lo que corresponde con un proceso inflamatorio en curso. Esta ocasión el individuo 6 resolvió la linfocitosis, no así el bovino 5 quien vio elevados sus valores linfocitarios. La elevación de neutrófilos posterior a la inoculación de las dosis de adyuvante podría deberse a la reacción inflamatoria subsecuente (Schalm, 2010).

En lo que al hemograma realizado el día 31 al grupo de tratamiento, se hizo manifiesta la persistencia de neutrofilia con excepción del individuo 6. Las bandas se vieron aumentadas únicamente en los individuos 3 y 6. La linfocitosis fue manifestada por todos los individuos a excepción del bovino 6. A su vez los bovinos 1 y 6 mostraron monocitosis. Lo que sigue siendo consecuente con un proceso inflamatorio debido al adyuvante y a la presencia de la estimulación antigénica (Schalm, 2010). Debido a la presencia de linfocitosis persistente en la mayoría de los individuos de ambos grupos, debería mantenerse como diagnóstico diferencial la posible presencia de BLV en el hato.

Existe evidencia de la presencia de anticuerpos anti SARS-CoV-2 en leche de mujeres lactantes que padecieron COVID-19 o fueron inmunizadas con alguna de las vacunas aprobadas de emergencia (Garib et al, 2022; Gray et al, 2021). Dado que se conoce el potencial de la generación de anticuerpos contra algunos agentes virales tales como BCoV y Rotavirus (Garib et al, 2022; Arenas et al, 2021), además de diferentes componentes con actividad antibacteriana como lactoperoxidasas, lisozima, lactoferrinas, etc (Arenas et al, 2021; Tizard, 2018) existe el interés de conocer la capacidad de la proteína en estudio de generar anticuerpos en leche que potencialmente podrían servir como terapia inmunoestimulante contra SARS-CoV-2.

Además la especificidad de los anticuerpos presentes en leche o calostro bovino puede ser aumentada realizando vacunación previo a la colecta de las muestras, posteriormente el calostro hiperinmune debería estar enriquecido con anticuerpos IgG1 con la capacidad de reconocer al antígeno presente en la vacuna (Ulfman et al, 2018).

A diferencia de varias especies de primates, incluida el ser humano, cuya clase predominante de anticuerpos en calostro y leche es IgA; en los rumiantes, concretamente en los bovinos, la subclase de anticuerpos que se encuentran presentes en mayor cantidad en ambas secreciones son IgG1; sin embargo, en las demás superficies corporales de estos animales, además de esta subclase, se encuentra presente en altas cantidades IgA. A su vez IgG2 está presente en la saliva y el intestino. Se estima de manera general, que las inmunoglobulinas de clase IgG poseen una respuesta más efectiva en la protección de las vías respiratorias que en el tracto gastrointestinal (Hurley & Theil, 2011; Tizard, 2018).

Por tanto, se esperaba encontrar una mayor cantidad de anticuerpos de isotipo IgG que IgA, debido a su mayor abundancia en la leche bovina (Tizard, 2018; Ulfman et al, 2018). Sin embargo, la mayor titulación de anticuerpos se dio en suero con isotipo IgG al día 90 con una densidad óptica de 0.47 teniendo una diferencia significativa entre el grupo inmunizado en los días: 0 y 60, 0 y 90; así como 31 y 60 y 31 y 90.

La mayor DO del grupo inmunizado en la detección de IgA en suero fue de 0.127 por lo que se considera nula la generación de anticuerpos IgA en suero.

Asimismo la mayor DO del grupo inmunizado para la detección de IgG en leche fue 0.12 al día 31 post inmunización y para el isotipo IgA en leche fue de 0.64 en el día 60, por lo que se considera ausente la generación de anticuerpos en leche. Lo cual se hipotetiza pudo suceder debido a las bajas concentraciones usadas en la formulación vacunal.

VIII. CONCLUSIONES.

La seguridad de la vacuna Quivax 17.4 ha sido comprobada debido a la ausencia de efectos secundarios adversos en los animales inmunizados: Se descartó la presencia de cuadros febriles postvacunales así como alteraciones hematológicas directamente relacionadas con la administración de la proteína; únicamente lesiones inflamatorias localizadas leves fueron registradas en el sitio de aplicación mismas que desaparecieron alrededor del día 60 post inmunización. Por su parte, la inmunogenicidad de la proteína fue demostrada debido a la detección de anticuerpos IgG en el suero de los bovinos inmunizados con una mayor DO= 0.47 al día 90 post inmunización; sin embargo no fue posible la detección de anticuerpos IgA en suero y leche, así como IgA en suero.

Por tanto se concluye que las concentraciones de proteína utilizadas durante el presente experimento son suficientes para la generación de anticuerpos de isotipo IgG en la sangre de los bovinos inmunizados; sin embargo, dichas concentraciones no fueron suficientes para lograr la generación de anticuerpos de isotipo IgG ni IgA en leche, ni IgA en suero. Por lo que concentraciones mayores deben ser estudiadas en bovinos para encontrar la adecuada en la que exista generación de anticuerpos y no se presenten reacciones adversas.

IX. REFERENCIAS

- Abdul-Rasool, S., & Fielding, B. C. (2010). Understanding Human Coronavirus HCoV-NL63. *The open virology journal*, 4, 76–84. <https://doi.org/10.2174/1874357901004010076>
- Arenas A, Borge C, Carbonero A, Garcia-Bocanegra I, Cano-Terriza D, Caballero J and Arenas-Montes A (2021) Bovine Coronavirus Immune Milk Against COVID-19. *Front. Immunol.* 12:637152. doi: 10.3389/fimmu.2021.637152
- Arya, R., Kumari, S., Pandey, B., Mistry, H., Bihani, S. C., Das, A., Prashar, V., Gupta, G. D., Panicker, L., & Kumar, M. (2021). Structural insights into SARS-CoV-2 proteins. *Journal of molecular biology*, 433(2), 166725. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.11.024>
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J. G, & Smith, J. A. (2003). *Current Protocol in Molecular Biology* (K. Struhl (ed.)). JohnWiley & Sons Inc
- Bakhiet, M., & Taurin, S. (2021). SARS-CoV-2: Targeted managements and vaccine development. *Cytokine & growth factor reviews*, 58, 16-29.
- Bande, F., Arshad, S. S., Omar, A. R., Bejo, M. H., Abubakar, M. S., & Abba, Y. (2016). *Pathogenesis and Diagnostic Approaches of Avian Infectious Bronchitis. Advances in Virology, 2016, 1–11.* doi:10.1155/2016/4621659
- Barnes, C. O., Jette, C. A., Abernathy, M. E., Dam, K. A., Esswein, S. R., Gristick, H. B., Malyutin, A. G., Sharaf, N. G., Huey-Tubman, K. E., Lee, Y. E., Robbiani, D. F., Nussenzweig, M. C., West, A. P., Jr, & Bjorkman, P. J. (2020). SARS-CoV-2 neutralizing antibody structures inform therapeutic strategies. *Nature*, 588(7839), 682–687. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2852-1>
- Bio-Rad Laboratories (2010). Bio- Rad protein assay (Bradford). *Bio-Rad*, 1-24
- Bowersock, T. L., & Martin, S. (1999). Vaccine delivery to animals. *Advanced drug delivery reviews*, 38(2), 167–194. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(99\)00015-0](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(99)00015-0)
- Brooks, M. B., Harr, K. E., Seelig, D. M., Wardrop, K. J., & Weiss, D. J. (2010). *Schalm's Veterinary Hematology*. Wiley.
- Centeno-Tablante, E., Medina-Rivera, M., Finkelstein, J. L., Rayco-Solon, P., Garcia-Casal, M. N., Rogers, L., Ghezzi-Kopel, K., Ridwan, P., Peña-Rosas, J. P., & Mehta, S. (2021). Transmission of SARS-CoV-2 through breast milk and breastfeeding: a living systematic review. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1484(1), 32–54. <https://doi.org/10.1111/nyas.14477>
- CDC, 2021 (1) <https://espanol.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html?CDC>
- CDC, 2021 (4) <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/science/science-briefs/sars-cov-2-transmission.html>
- CDC, 2022. (6) <https://espanol.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/testing.html>

- Cao, Y., Yang, R., Lee, I., Zhang, W., Sun, J., Wang, W., & Meng, X. (2021). Characterization of the SARS-CoV -2 E Protein: Sequence, Structure, Viroporin, and Inhibitors. *Protein Science*, 30(6), 1114–1130. doi:10.1002/pro.4075
- <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/science/science-briefs/sars-cov-2-transmission.html>
- Chafekar, A., & Fielding, B. (2018). MERS-CoV: Understanding the Latest Human Coronavirus Threat. *Viruses*, 10(2), 93. doi:10.3390/v10020093
- Chams N, Chams S, Badran R, Shams A, Araji A, Raad M, Mukhopadhyay S, Stroberg E, Duval EJ, Barton LM and Hajj Hussein I (2020) COVID-19: A Multidisciplinary Review. *Front. Public Health* 8:383. doi: 10.3389/fpubh.2020.00383
- Christie, M. J., Irving, A. T., Forster, S. C., Marsland, B. J., Hansbro, P. M., Hertzog, P. J., Nold-Petry, C. A., & Nold, M. F. (2021). Of bats and men: Immunomodulatory treatment options for COVID-19 guided by the immunopathology of SARS-CoV-2 infection. *Science immunology*, 6(63), eabd0205. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abd0205>
- COFEPRIS, 2021, (7) <https://www.gob.mx/cofepris/articulos/cofepris-emite-autorizacion-para-uso-de-emergencia-a-vacuna-sinopharm?idiom=es>
- CONACYT, (2022) <https://datos.covid-19.conacyt.mx/>

● CoVariants

- Decaro, N., & Lorusso, A. (2020). Novel human coronavirus (SARS-CoV-2): A lesson from animal coronaviruses. *Veterinary Microbiology*, 244, 108693. doi:10.1016/j.vetmic.2020.108693
- Decaro, N., Martella, V., Saif, L. J., & Buonavoglia, C. (2020). *COVID-19 from veterinary medicine and one health perspectives: What animal coronaviruses have taught us*. *Research in Veterinary Science*, 131, 21–23. doi:10.1016/j.rvsc.2020.04.009
- Delaune, D., Hul, V., Karlsson, E.A. *et al.* (2021) “A novel SARS-CoV-2 related coronavirus in bats from Cambodia”. *Nat Commun* 12, 6563 <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26809-4>
- Dinesh DC, Chalupska D, Silhan J, Koutna E, Nencka R, Veverka V, et al. (2020) Structural basis of RNA recognition by the SARS-CoV-2 nucleocapsid phosphoprotein. *PLoS Pathog* 16(12): e1009100. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009100>
- ECDC (2022). <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/epidemiological-update-sars-cov-2-omicron-sub-lineages-ba4-and-ba5>
- FAO (2011) “*Manual de Buenas Prácticas de Ordeño*” Recuperado de: <https://www.fao.org/3/bo952s/bo952s.pdf>
- Fan, Y., Li, X., Zhang, L. et al. SARS-CoV-2 Omicron variant: recent progress and future perspectives. *Sig Transduct Target Ther* 7, 141 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00997-x>

- Fehr A.R., Perlman S. (2015). *Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis*. In: Maier H., Bickerton E., Britton P. (eds) *Coronaviruses. Methods in Molecular Biology*, vol 1282. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7_1
- Focosi, D., & Maggi, F. (2022). Recombination in Coronaviruses, with a Focus on SARS-CoV-2. *Viruses*, 14(6), 1239. <https://doi.org/10.3390/v14061239>
- Garib, V., Katsamaki, S., Turdikulova, S., Levitskaya, Y., Zahidova, N., Bus, G., Karamova, K., Rakhmedova, M., Magbulova, N., Bruhov, A., Garib, F. Y., & Abdurakhmonov, I. Y. (2022). Milk of Cow and Goat, Immunized by Recombinant Protein Vaccine ZF-UZ-VAC2001(Zifivax), Contains Neutralizing Antibodies Against SARS-CoV-2 and Remains Active After Standard Milk Pasteurization. *Frontiers in nutrition*, 9, 901871. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.901871>
- Gorbalenya, A. E., Baker, S. C., Baric, R. S., de Groot, R. J., Drosten, C., Gulyaeva, A. A., ... & Ziebuhr, J. (2020). Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: The species and its viruses—a statement of the Coronavirus Study Group. *BioRxiv*.
- Gray, K. J., Bordt, E. A., Atyeo, C., Deriso, E., Akinwunmi, B., Young, N., Baez, A. M., Shook, L. L., Cvrk, D., James, K., De Guzman, R., Brigida, S., Diouf, K., Goldfarb, I., Bebell, L. M., Yonker, L. M., Fasano, A., Rabi, S. A., Elovitz, M. A., Alter, G., ... Edlow, A. G. (2021). Coronavirus disease 2019 vaccine response in pregnant and lactating women: a cohort study. *American journal of obstetrics and gynecology*, 225(3), 303.e1–303.e17. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2021.03.023>
- Guo, M., Tao, W., Flavell, R.A. et al. (2021). Potential intestinal infection and faecal–oral transmission of SARS-CoV-2. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 18, 269–283. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00416-6>
- Haakenson, J., Huang, R., & Vaughn V. Smider (2018). Diversity in the Cow Ultralong CDR H3 Antibody Repertoire.
- Hartenian, E., Nandakumar, D., Lari, A., Ly, M., Tucker, J.M. & Glaunsinger, B.A. (2020). The Molecular Virology of Coronaviruses. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.013930>
- Harvey, W.T., Carabelli, A.M., Jackson, B. et al. (2021). SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. *Nat Rev Microbiol* 19, 409–424 <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00573-0>
- He, Q., Guo, Z., Zhang, B., Yue, H., & Tang, C. (2019). First detection of bovine coronavirus in Yak (*Bos grunniens*) and a bovine coronavirus genome with a recombinant HE gene. *The Journal of general virology*, 100(5), 793–803. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001254>
- Henry, R. (2020). Etymologia: Coronavirus. *Emerging Infectious Diseases*, 26(5), 1027. <https://doi.org/10.3201/eid2605.et2605>.
- Hirano, T., & Murakami, M. (2020). COVID-19: A New Virus, but a Familiar Receptor and Cytokine Release Syndrome. *Immunity*. doi:10.1016/j.immuni.2020.04.003

- Hillen H. S. (2021). Structure and function of SARS-CoV-2 polymerase. *Current opinion in virology*, 48, 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.03.010>
- Hirabara, S. M., Serdan, T., Gorjao, R., Masi, L. N., Pithon-Curi, T. C., Covas, D. T., Curi, R., & Durigon, E. L. (2022). SARS-COV-2 Variants: Differences and Potential of Immune Evasion. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 781429. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.781429>
- Huang, Y., Yang, C., Xu, Xf. et al. (2020) Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19. *Acta Pharmacol Sin* 41, 1141–1149 . <https://doi.org/10.1038/s41401-020-0485-4>
- Hurley, W. L., & Theil, P. K. (2011). Perspectives on immunoglobulins in colostrum and milk. *Nutrients*, 3(4), 442–474. <https://doi.org/10.3390/nu3040442>
- Huynh, J., Li, S., Yount, B., Smith, A., Sturges, L., Olsen, J.C., Nagel, J., Johnson, J.B., Agnihothram, S., Gates, J.E., Frieman, M.B., Baric, R.S., Donaldson, E.F. (2012) Evidence Supporting a Zoonotic Origin of Human Coronavirus Strain NL63. *Journal of Virology*. <https://doi.org/10.1128/JVI.00906-12>
- ICTV, (2023). https://ictv.global/report_9th/RNApos/Nidovirales/Coronaviridae
- Institute of Medicine (US) Forum on Microbial Threats, Knobler, S., Mahmoud, A., Lemon, S., Mack, A., Sivitz, L., & Oberholtzer, K. (Eds.). (2004). *Learning from SARS: Preparing for the Next Disease Outbreak*. National Academies Press (US).
- Islam, A., Ferdous, J., Islam, S., Sayeed, M. A., Dutta Choudhury, S., Saha, O., ... Shirin, T. (2021). Evolutionary Dynamics and Epidemiology of Endemic and Emerging Coronaviruses in Humans, Domestic Animals, and Wildlife. *Viruses*, 13(10), 1908. doi:10.3390/v13101908
- Jackson, C.B., Farzan, M., Chen, B. et al. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells (2022). *Nat Rev Mol Cell Biol* 23, 3–20 . <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00418-x>
- Jad Gerges Harb, Hussein A Noureldine, Georges Chedid, Mariam Nour Eldine, Dany Abou Abdallah, Nancy Falco Chedid, Wared Nour-Eldine (2020). SARS, MERS and COVID-19: clinical manifestations and organ-system complications: a mini review, *Pathogens and Disease*, Volume 78, Issue 4, June 2020, ftaa033, <https://doi.org/10.1093/femspd/ftaa033>
- Jang, S. I., Lillehoj, H. S., Lee, S. H., Lee, K. W., Lillehoj, E. P., Bertrand, F., Dupuis, L., & Deville, S. (2011). Montanide™ ISA 71 VG adjuvant enhances antibody and cell-mediated immune responses to profilin subunit antigen vaccination and promotes protection against *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella*. *Experimental parasitology*, 127(1), 178–183. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.07.021>
- 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>
- Jiang, S., He, Y., & Liu, S. (2005). SARS vaccine development. *Emerging infectious diseases*, 11(7), 1016–1020. <https://doi.org/10.3201/1107.050219>

- José Soler, M., Lloveras, J., & Batlle, D. (2008). Enzima conversiva de la angiotensina 2 y su papel emergente en la regulación del sistema renina-angiotensina. *Medicina Clínica*, 131(6), 230–236. doi:10.1157/13124619
- Ke, Z., Oton, J., Qu, K. *et al* (2020) Structures and distributions of SARS-CoV-2 spike proteins on intact virions. *Nature* 588, 498–502. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2665-2>
- Klimka, A., Michels, L., Glowalla, E., Tosetti, B., Krönke, M., & Krut, O. (2015). Montanide ISA 71 VG is Advantageous to Freund's Adjuvant in Immunization Against *S. aureus* Infection of Mice. *Scandinavian journal of immunology*, 81(5), 291–297. <https://doi.org/10.1111/sji.12279>
- Kuby (2018). *Kuby Immunology* (8o). MACMILLAN.
- Lan, J., Ge, J., Yu, J. *et al*. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature* 581, 215–220 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2180-5>
- Laue, M., Kauter, A., Hoffmann, T., Möller, L., Michel, J., & Nitsche, A. (2021). Morphometry of SARS-CoV and SARS-CoV-2 particles in ultrathin plastic sections of infected Vero cell cultures. *Scientific reports*, 11(1), 3515. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82852-7>
- Lednicky, J.A., Tagliamonte, M.S., White, S.K. *et al*. (2021). *Independent infections of porcine deltacoronavirus among Haitian children*. *Nature* 600, 133–137 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04111-z>
- Lin, A. V. (2015). Indirect ELISA. In *ELISA: Methods and Protocols* (Vol. 1318, pp. 1-216). <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2742-5>
- Liu, D. X., Liang, J. Q., & Fung, T. S. (2021). Human Coronavirus-229E, -OC43, -NL63, and -HKU1 (*Coronaviridae*). *Encyclopedia of Virology*, 428–440. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21501-X>
- Liu, K., Pan, X., Li, L., Yu, F., Zheng, A., Du, P., Han, P., Meng, Y., Zhang, Y., Wu, L., Chen, Q., Song, C., Jia, Y., Niu, S., Lu, D., Qiao, C., Chen, Z., Ma, D., Ma, X., Tan, S., ... Wang, Q. (2021). Binding and molecular basis of the bat coronavirus RaTG13 virus to ACE2 in humans and other species. *Cell*, 184(13), 3438–3451.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.05.031>
- McVey, S., & Shi, J. (2010). Vaccines in veterinary medicine: a brief review of history and technology. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 40(3), 381–392. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.02.001>
- Meekins, D. A., Gaudreault, N. N., & Richt, J. A. (2021). Natural and Experimental SARS-CoV-2 Infection in Domestic and Wild Animals. *Viruses*, 13(10), 1993. <https://doi.org/10.3390/v13101993>
- Mistry P, Barmania F, Mellet J, Peta K, Strydom A, Viljoen IM, James W, Gordon S and Pepper MS (2022) SARS-CoV-2 Variants, Vaccines, and Host Immunity. *Front. Immunol.* 12:809244. doi: 10.3389/fimmu.2021.809244
- Mordecai, G. J., Miller, K. M., Di Cicco, E., Schulze, A. D., Kaukinen, K. H., Ming, T. J., Li, S., Tabata, A., Teffer, A., Patterson, D. A., Ferguson, H. W., & Suttle, C. A.

- (2019). Endangered wild salmon infected by newly discovered viruses. *eLife*, 8, e47615. <https://doi.org/10.7554/eLife.47615>
- NIŠAVIĆ, J., MILIĆ, N., & RADALJ, A (2020). *Overview of the Most Significant Coronavirus Infections in Veterinary Medicine* <https://doi.org/10.2298/VETGL2001001N>
 - Noble, J.E., & Bailey, M. J.A. (2009) Chapter 8 Quantitation of Protein. *In Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 463, Issue C). Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63008-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63008-1)
 - OIE, “Manual de Métodos de Muestreo” Recuperado de: https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/1.1.01_Muestreo_2007.pdf
 - OIE (s/f) “Manual de Recolección, Conservación y Envío de Muestras al Laboratorio para Diagnostico de las Enfermedades Comunes de los Animales” Recuperado de: https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Self-declarations/Archives/Anexo_4._Manual_de_toma_y_remision_de_muestras.pdf
 - Papayannopoulos, V. (2017). Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nature Reviews Immunology*, 18(2), 134–147. doi:10.1038/nri.2017.105
 - Páramo, J. A. (2020). RESPUESTA INFLAMATORIA EN RELACIÓN A COVID-19 Y OTROS FENOTIPOS PROTROMBÓTICOS. *Reumatología Clínica*. doi:10.1016/j.reuma.2020.06.004
 - Parks, J. M., & Smith, J. C. (2020). How to discover antiviral drugs quickly. *New England Journal of Medicine*, 382(23), 2261-2264.
 - Peeling, R. W., Heymann, D. L., Teo, Y. Y., & Garcia, P. J. (2022). Diagnostics for COVID-19: moving from pandemic response to control. *The Lancet*, 399(10326), 757–768. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)02346-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(21)02346-1)
 - Piccoli, L., Park, Y. J., Tortorici, M. A., Czudnochowski, N., Walls, A. C., Beltramello, M., Silacci-Fregni, C., Pinto, D., Rosen, L. E., Bowen, J. E., Acton, O. J., Jaconi, S., Guarino, B., Minola, A., Zatta, F., Sprugasci, N., Bassi, J., Peter, A., De Marco, A., Nix, J. C., ... Veesler, D. (2020). Mapping Neutralizing and Immunodominant Sites on the SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain by Structure-Guided High-Resolution Serology. *Cell*, 183(4), 1024–1042.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.037>
 - Pollet, J., Chen, W.-H., & Strych, U. (2021). Recombinant protein vaccines, a proven approach against coronavirus pandemics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 170, 71–82. doi:10.1016/j.addr.2021.01.001
 - Poudel U, Subedi D, Pantha S, Dhakal S. (2020). Animal coronaviruses and coronavirus disease 2019: lesson for One Health approach. *Open Vet J* 2020;10:239–251
 - Pirc, K., Dijkman, R., Deng, L., Jebbink, M. F., Ross, H. A., Berkhout, B., van der Hoek, L. (2006). Mosaic Structure of Human Coronavirus NL63, One Thousand Years of Evolution. *Journal of Molecular Biology*, 364(5), 964–973. doi:10.1016/j.jmb.2006.09.074

- Qiagen, (2003). The QIA expressionist. In Qiagen GmbH, Düsseldorf, Germany (Issue June). <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=search&q=intitle:The+QIA+expressionist+TM#0>
- Rabaan, A. A., Al-Ahmed, S. H., Haque, S., Sah, R., Tiwari, R., Malik, Y. S., Dhama, K., Yattoo, M. I., Bonilla-Aldana, D. K., & Rodriguez-Morales, A. J. (2020). SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-COV: A comparative overview. *Le infezioni in medicina*, 28(2), 174–184.
- Raj, R. (2020). Analysis of non-structural proteins, NSPs of SARS-CoV-2 as targets for computational drug designing. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 100847. doi:10.1016/j.bbrep.2020.100847
- Rastogi, M., Pandey, N., Shukla, A. et al. (2020) SARS coronavirus 2: from genome to infectome. *Respir Res* 21, 318 <https://doi.org/10.1186/s12931-020-01581-z>
- Redondo N, Zaldívar-López S, Garrido JJ & Montoya M (2021) SARS-CoV-2 Accessory Proteins in Viral Pathogenesis: Knowns and Unknowns. *Front. Immunol.* 12:708264. doi: 10.3389/fimmu.2021.708264
- Rodrigues, P., Alrubayyi, A., Pring, E., Bart, V., Jones, R., Coveney, C., Lu, F., Tellier, M., Maleki-Toyserkani, S., Richter, F. C., Scourfield, D. O., Gea-Mallorquí, E., & Davies, L. C. (2020). Innate immunology in COVID-19-a living review. Part II: Dysregulated inflammation drives immunopathology. *Oxford open immunology*, 1(1), iqaa005. <https://doi.org/10.1093/oxfimm/iqaa005>
- Roth J. A. (1999). Mechanistic bases for adverse vaccine reactions and vaccine failures. *Advances in veterinary medicine*, 41, 681–700. [https://doi.org/10.1016/s0065-3519\(99\)80053-6](https://doi.org/10.1016/s0065-3519(99)80053-6)
- Saif LJ. (2004). ANIMAL CORONAVIRUSES: LESSONS FOR SARS. Learning from SARS: Preparing for the Next Disease Outbreak: Workshop Summary. Washington (DC): National Academies Press (US)
- Sajdel-Sulkowska E. M. (2021). A Dual-Route Perspective of SARS-CoV-2 Infection: Lung- vs. Gut-specific Effects of ACE-2 Deficiency. *Frontiers in pharmacology*, 12, 684610. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.684610>
- Schoch CL, et al. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database (Oxford)*. 2020: baaa062. PubMed: 32761142 PMC: PMC7408187. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=2587487&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>
- Sellon, D. C., & Long, M. T. (2013). *Equine infectious diseases E-book*. Elsevier Health Sciences.
- Sharma, S., & Hinds, L. A. (2012). Formulation and delivery of vaccines: Ongoing challenges for animal management. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 4(4), 258–266. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.103231>
- K. Sharun, R. Tiwari, A.R.A. Saied, K. Dhama SARS-CoV-2 vaccine for domestic and captive animals: an effort to counter COVID-19 pandemic at the human-animal interface *Vaccine*, 39 (2021), pp. 7119-7122, 10.1016/J.VACCINE.2021.10.053

- Shin, D., Mukherjee, R., Grewe, D. et al. (2020) Papain-like protease regulates SARS-CoV-2 viral spread and innate immunity. *Nature* 587, 657–662 <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2601-5>
- Soler, M. J., Lloveras, J., & Batlle, D. (2008). Enzima conversiva de la angiotensina 2 y su papel emergente en la regulación del sistema renina-angiotensina [Angiotensin converting enzyme 2 and its emerging role in the regulation of the renin angiotensin system]. *Medicina clínica*, 131(6), 230-236. <https://doi.org/10.1157/13124619>
- Su, S., Wong, G., Shi, W., Liu, J., Lai, A. C. K., Zhou, J., ... Gao, G. F. (2016). Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends in Microbiology*, 24(6), 490–502. doi:10.1016/j.tim.2016.03.003
- Tay, M. Z., Poh, C. M., Rénia, L., MacAry, P. A., & Ng, L. F. P. (2020). The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nature Reviews Immunology*. doi:10.1038/s41577-020-0311-8
- Tarke, A., Sidney, J., Kidd, C. K., Dan, J. M., Ramirez, S. I., Yu, E. D., ... Sette, A. (2021). Comprehensive analysis of T cell immunodominance and immunoprevalence of SARS-CoV-2 epitopes in COVID-19 cases. *Cell Reports Medicine*, 2(2), 100204. doi:10.1016/j.xcrm.2021.100204
- **The ViralZone**
- Tizard, (2018). *Inmunología Veterinaria* (10.a ed.). Elsevier España, S.L.U.
- Tizard I. R. (2020). Vaccination against coronaviruses in domestic animals. *Vaccine*, 38(33), 5123–5130. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.06.026>
- Trigo, (2023). *Patología Sistemica Veterinaria* (5.a ed.). MCGRAW HILL EDDUCATION.
- Ulfman LH, Leusen JHW, Savelkoul HFJ, Warner JO and van Neerven RJJ (2018) Effects of Bovine Immunoglobulins on Immune Function, Allergy, and Infection. *Front. Nutr.* 5:52. doi: 10.3389/fnut.2018.00052
- UNAM (s.f.) Manual de Prácticas de Clínicas de Bovinos I
- University of Glasgow, (s.f.) Clinical examination of the cow
- Varghese, P. M., Tsolaki, A. G., Yasmin, H., Shastri, A., Ferluga, J., Vatish, M., Madan, T., & Kishore, U. (2020). Host-pathogen interaction in COVID-19: Pathogenesis, potential therapeutics and vaccination strategies. *Immunobiology*, 225(6), 152008. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2020.152008>
- Wang, M., Yan, M., Xu, H., Liang, W., Kan, B., Zheng, B., Chen, H., Zheng, H., Xu, Y., Zhang, E., Wang, H., Ye, J., Li, G., Li, M., Cui, Z., Liu, Y. F., Guo, R. T., Liu, X. N., Zhan, L. H., Zhou, D. H., ... Xu, J. (2005). SARS-CoV infection in a restaurant from palm civet. *Emerging infectious diseases*, 11(12), 1860–1865. <https://doi.org/10.3201/eid1112.041293>
- Wang, M. Y., Zhao, R., Gao, L. J., Gao, X. F., Wang, D. P., & Cao, J. M. (2020). SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 587269. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.587269>

- Wang, C. C., Prather, K. A., Sznitman, J., Jimenez, J. L., Lakdawala, S. S., Tufekci, Z., & Marr, L. C. (2021). Airborne transmission of respiratory viruses. *Science (New York, N.Y.)*, 373(6558), eabd9149. <https://doi.org/10.1126/science.abd9149>
- Wang, L., & Yoo, D. (2022). Animal coronaviruses. In *Animal coronaviruses* (pp. 3-19). New York, NY: Springer US.
- Weng, J.-R., Lin, C.-S., Lai, H.-C., Lin, Y.-P., Wang, C.-Y., Tsai, Y.-C., ... Lin, C.-W. (2019). Antiviral activity of *Sambucus Formosana* Nakai ethanol extract and related phenolic acid constituents against human coronavirus NL63. *Virus Research*, 273, 197767. doi:10.1016/j.virusres.2019.19776
- Wheeler, T. T., Hodgkinson, A. J., Prosser, C. G., & Davis, S. R. (2007). Immune Components of Colostrum and Milk—A Historical Perspective. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 12(4), 237–247. doi:10.1007/s10911-007-9051-7
- White, J. M., Delos, S. E., Brecher, M., & Schornberg, K. (2008). Structures and mechanisms of viral membrane fusion proteins: multiple variations on a common theme. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 43(3), 189–219. <https://doi.org/10.1080/10409230802058320>
- WHO, 2022 (2) <https://www.who.int/es/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>
- WHO, 2021 (3) <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/coronavirus-disease-covid-19-how-is-it-transmitted>
- WHO, 2021 (5); <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/question-and-answers-hub/q-a-detail/coronavirus-disease-covid-19>.
- WHO, 2022. (8) <https://covid19.trackvaccines.org/agency/who> .
- Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Chu, C. -m., Chan, K. -h., Tsoi, H. -w., Huang, Y., ... Yuen, K. -y. (2004). Characterization and Complete Genome Sequence of a Novel Coronavirus, Coronavirus HKU1, from Patients with Pneumonia. *Journal of Virology*, 79(2), 884–895. doi:10.1128/jvi.79.2.884-895.2005
- Woo, P., Lau, S., Yip, C., Huang, Y., Yuen, K.-Y. (2009). More and More Coronaviruses: Human Coronavirus HKU1. *Viruses*, 1(1), 57–71. doi:10.3390/v1010057
- Xia Chao, Y., Röttschke, O., & Tan, E.-K. (2020). The role of IgA in COVID-19. *Brain, Behavior, and Immunity*. doi:10.1016/j.bbi.2020.05.057
- Xiao, K., Zhai, J., Feng, Y. *et al.* (2020) Isolation of SARS-CoV-2-related coronavirus from Malayan pangolins. *Nature* 583, 286–289 <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2313-x>
- Yalcin, H. C., Sukumaran, V., Al-Ruweidi, M., & Shurbaji, S. (2021). Do Changes in ACE-2 Expression Affect SARS-CoV-2 Virulence and Related Complications: A Closer Look into Membrane-Bound and Soluble Forms. *International journal of molecular sciences*, 22(13), 6703. <https://doi.org/10.3390/ijms22136703>
- Yang, Y., Xiao, Z., Ye, K. *et al.* SARS-CoV-2: characteristics and current advances in research. *Virol J* 17, 117 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01369-z>

- Ye Q., West A.M.V., Silletti S., Corbett K.D. (2020). Architecture and self-assembly of the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. *Protein Sci.* 2020; **29**: 1890-1901 <https://doi.org/10.1002/pro.3909>
- Yujia Alina Chan, Shing Hei Zhan, The Emergence of the Spike Furin Cleavage Site in SARS-CoV-2, *Molecular Biology and Evolution*, Volume 39, Issue 1, January 2022, msab327, <https://doi.org/10.1093/molbev/msab327>
- Zaki, A. M., van Boheemen, S., Bestebroer, T. M., Osterhaus, A. D. M. E., & Fouchier, R. A. M. (2012). *Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia.* *New England Journal of Medicine*, 367(19), 1814–1820. doi:10.1056/nejmoa1211721
- Zhao, Y., Jackson, S. M., & Aitken, R. (2006). *The bovine antibody repertoire.* *Developmental & Comparative Immunology*, 30(1-2), 175–186. doi:10.1016/j.dci.2005.06.012
- Zheng, J., Deng, Y., Zhao, Z., Mao, B., Lu, M., Lin, Y., Huang, A. (2022). Characterization of SARS-CoV-2-specific humoral immunity and its potential applications and therapeutic prospects. *Cellular & molecular immunology*, 19(2), 150–157. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00774-w>
- Zhou, P., Fan, H., Lan, T. et al (2018). *Fatal swine acute diarrhoea syndrome caused by an HKU2-related coronavirus of bat origin.* *Nature* 556, 255–258 <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0010-9>
- Zhou, Z., Qiu, Y. & Ge, X. *The taxonomy, host range and pathogenicity of coronaviruses and other viruses in the Nidovirales order.* *Animal Diseases* 1, 5 (2021). <https://doi.org/10.1186/s44149-021-00005-9>