



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

**Evaluación de la Respuesta Inmune en conejos inducida por  
una Vacuna Experimental de Herpesvirus Canino inactivada**

**TESIS**

Para obtener el título de

Licenciada en Bioquímica Diagnostica

**PRESENTA**

Cynthia Monserrath Hernández Campos

**ASESOR DE TESIS**

Dr. Guillermo Valdivia Anda

Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo fue realizado con el apoyo de la UNAM, a través de la DGAPA con los proyectos:

**Proyecto PAPIIT: IT-202114** “Evaluación de la enfermedad de Herpesvirus canino en México y Desarrollo de posibles medidas para su control y prevención.

**Proyecto PAPIIT: IT 201218.**- Desarrollo de un modelo en cultivos celulares para estudiar la latencia de Herpesvirus canino

Y fue desarrollado en el Laboratorio de Patogenicidad Microbiana de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM.

Se agradece al M en C Cesar Cuenca Verde por el apoyo técnico brindado para la realización del trabajo.

“Tú puedes ver esta maravilla y muchas otras más de una vez, pero siempre y por siempre  
habrá sólo una primera vez”

-Gary Jennings

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo es dedicado a mi pequeño Elian y a mi familia, quienes han sido parte fundamental para concluir este proyecto. Gracias por su apoyo, tiempo, consejos y sobre todo por no perder la fe en mí.

A mis asesores y mentores durante el proyecto, el Dr. Guillermo Valdivia y Cesar Cuenca.

A mis compañeros de la facultad y que hoy son grandes amigos, gracias a Aranza, Ingrid, Gerardo, Heidi, Julio y Diego, ¡Aprendí demasiado de ustedes!

A mis compañeras y amigas del laboratorio Lulú y Monse, sin ustedes hubiera escapado apenas comencé el proyecto.

## INDICE

<b>1. RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>2</b>
2.1 Generalidades del Herpesvirus Canino (HVC) .....	2
2.2 Elaboración de vacunas .....	3
2.3 Técnicas inmunológicas (Seroneutralización, ELISA, Inmunoperoxidasa) .....	4
2.4 Vacuna de Herpesvirus Canino .....	5
<b>3. ANTECEDENTES .....</b>	<b>6</b>
<b>4. HIPÓTESIS.....</b>	<b>7</b>
<b>5. OBJETIVOS .....</b>	<b>7</b>
5.2 Objetivo general .....	7
5.3 Objetivos específicos .....	7
<b>6. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>8</b>
<b>7. METODOLOGÍA.....</b>	<b>9</b>
7.1 Elaboración de la vacuna experimental de HVC .....	9
7.1.1 Preparación del inoculo de HVC .....	9
7.1.2 Inactivación del virus mediante Ac. Ascórbico-Cu (II) .....	9
7.1.3 Preparación del inoculo experimental.....	10
7.1.4 Inoculación del producto biológico experimental .....	10
7.2 Detección de IgG de conejo mediante la técnica de Seroneutralización.....	12
7.2.1 Determinación del título viral de HVD .....	12
7.2.2 Inactivación del suero problema .....	13
7.2.3 Técnica de Seroneutralización .....	13
7.3 Detección de IgG de conejo mediante la técnica de Inmunoperoxidasa .....	13
7.4 Detección de IgG de conejo mediante la técnica de ELISA.....	14
7.4.1 Sensibilización de la placa .....	14
7.4.2 Bloqueo de la placa.....	14
7.4.3 Prueba de ELISA .....	14
<b>8. RESULTADOS.....</b>	<b>16</b>
8.1 Elaboración de la vacuna experimental .....	16
8.2 Detección de IgG de conejo mediante la técnica de Seroneutralización.....	18
8.2.2 Determinación del título viral de HVD .....	18
8.2.2 Técnica de Seroneutralización .....	20

8.3	Detección de IgG de conejo mediante la técnica de Inmunoperoxidasa .....	23
8.4	Detección de IgG de conejo mediante la técnica de ELISA.....	24
9.	DISCUSIÓN.....	28
10.	CONCLUSIONES .....	32
11.	PERSPECTIVAS.....	32
12.	BIBLIOGRAFIA .....	33
13.	ANEXOS .....	37

## Índice de Cuadros

<b>Cuadro 7.1</b>	<b>Resumen del diseño experimental de inmunización en el modelo .....</b>	<b>11</b>
Cuadro 7.2	Modelo experimental para la titulación de HVD en células MDBK.....	12
Cuadro 7.3	Modelo de montaje de la placa de ELISA.....	15
Cuadro 8.4	Absorbancias de la Técnica de Elisa de los sueros obtenidos cada semana de experimentación, ordenados por lote y grupo experimental. ....	25
Cuadro 8.5	Absorbancia y cálculo de diferencias de los sueros de la mezcla de conejo 1 y 2. ....	25



## Índice de Figuras

Figura 8.1Suspensiones experimentales: a) Emulsión: H <sub>2</sub> O des + Alumbre, b) Vacuna: HVCi+Adyuvante, y C) Solución de HVCi+PBS1x.....	16
Figura 8.2Cajas de cultivo de agar sangre sembradas con las soluciones experimentales: a) Emulsión, b) HVCi+Adyuvante y c) HVCi+PBS1x. ....	17
Figura 8.3Distribución del modelo animal. Agrupación de acuerdo a la suspensión administrada: a) Lote A: HVCi Adyuvante, b) Lote B HVCi+PBS1x y, c) Emulsión. ....	17
Figura 8.4Control negativo células MDBK 95% de confluencia, teñidas con cristal violeta. ....	19
Figura 8.5Titulación viral de HVD. Cambios líticos graduales por pozo sembradas con células MDBK con las diluciones seriadas del virus; a) Virus directo, b) dilución HVD 10-1, c) dilución HVD 10-2, d) dilución HVD10-3, e) dilución 10-4, f) dilución HVD 10-5, y g) diluciones de HVD 10 <sup>-6,7,8,9,10</sup> .....	19
Figura 8.6 Placa de titulación de HD y diluciones del mismo en células MDBK teñida con cristal violeta.....	20
Figura 8.7Controles de la Técnica de Seroneutralización. a) Control negativo: células MDBK + MEM 2% STN, b) Control negativo: Células + suero prob y c) Control positivo: Células MDBK + HVD.....	21
Figura 8.8Efectos del virus sobre las células, técnica de Seroneutralización. Cambios líticos en células MDBK inoculadas con HVD [1:40] y diluciones dobles del suero de conejo.....	22
Figura 8.9Efectos del virus en células MDBK, técnica Inmunoperoxidasa. Células en racimos por efecto del HVD [1:40].....	23
Figura 8.10Células MDBK afectadas por HVD [1:40]. Flecha izquierda células gigantes, flecha izquierda sincitios celular, observadas en la técnica de Inmunoperoxidasa. ....	24

## **1. RESUMEN**

La infección por Herpesvirus Canino es una patología que se presenta sobre todo en poblaciones como los criaderos. Es una afección importante que causa una marcada disminución en el éxito de la reproducción, causando serias pérdidas en cachorros neonatos, además de causar alteraciones en la fertilidad y fecundidad de las hembras.

En la actualidad el reporte constante de camadas de cachorros con signología y sintomatología descriptiva de Herpesvirus Canino (HVC) en criaderos Mexicanos, permitió enfocar el siguiente estudio en la prevención de la enfermedad, mediante el desarrollo de una vacuna inactivada con adyuvante a partir de una cepa de Herpesvirus canino aislada en México.

La preparación del biológico a inocular en conejos Nueva Zelanda, como modelo animal de experimentación, consistió en la inactivación del virus mediante la técnica de ac. Ascórbico-Cu (II), la adición de Hidróxido de Aluminio como adyuvante, y el análisis microbiológico de las suspensiones obtenidas. La evaluación de respuesta inmunitaria producida por la vacuna experimental se realizó con las técnicas diagnósticas de Seroneutralización (SN), ELISA e Inmunoperoxidasa (IP) y la evaluación histopatología de los órganos. Los resultados obtenidos de cada técnica inmunológica descartó la presencia de anticuerpos neutralizantes, IgG e IgM presentes en el suero de conejo, así como la ausencia del antígeno, Herpesvirus canino en la revisión de los órganos: hígado, riñón y cerebro. La vacuna experimental analizada con las técnicas diagnósticas (ELISA, SN e IP) demostró no ser inmunogénica.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 Generalidades del Herpesvirus Canino (HVC)

El Herpesvirus canino es un agente infeccioso caracterizado como el responsable de una enfermedad mortal en los cachorros recién nacidos y formas crónicas en adultos, provoca infecciones de la mucosa externa del aparato genital. (Ratud y col, 1998). En la enfermedad neonatal, los cachorros de menos de 4 semanas presentan signos que consisten en anorexia, disnea, dolor a la palpación abdominal, incoordinación y heces blandas amarillo verdosas. A veces ocurre descarga nasal serosa o hemorrágica. Las petequias son frecuentes en las membranas mucosas. La temperatura rectal no está elevada y puede presentarse trombocitopenia en cachorros moribundos, hecho que ocurre luego de un período de incubación de 3 a 8 días. Al respecto, existen dos factores que predisponen a que en los cachorros la infección con herpes virus sea generalmente fulminante: la temperatura óptima de la replicación viral (33 a 35°C) coincide con la de los tractos genital y respiratorio alto y a que los cachorros al nacer son relativamente inmaduros respecto de los centros termorreguladores hipotalámicos. Esto conduce a que la infección sea hipotermia dependiente, es decir, a mayor hipotermia, más grave y rápido es el desenlace (Carmichael, 2000).

El Herpesvirus Canino (HVC), perteneciente a la familia *Herpesviridae*, es un Herpesvirus-alfa de doble cadena de ADN, es sensible a los solventes lipídicos e inactivado a temperaturas sobre 40°C. Respecto al pH, es inestable entre pH de 5.0 y 8.0 y estable a 40°C y -70°C. Es totalmente inactivado a -200°C, a no ser que se adicione soluciones estabilizadoras. También es rápidamente inactivado por los desinfectantes comunes. El virus se desarrolla solamente en células de origen canino, siendo más apropiadas las células primarias o secundarias de riñón o testículo, aunque también se desarrolla en diversas líneas caninas. El crecimiento óptimo es a 34 - 35°C. En los cultivos celulares la mayoría de los aislamientos produce los típicos racimos de células redondeadas que se desprenden, dejando "placas claras". Al igual que el resto de los Herpesvirus, produce cuerpos de inclusión intranucleares en las células infectadas. (Carmichael, 2000).

Se han encontrado relaciones antigénicas débiles con otros Herpesvirus pero su significado aún no está claro (Reading, 1998). Igual que con otros Herpesvirus-alfa, el VHC queda latente después de la primo infección y es eliminado periódicamente, principalmente en las secreciones nasales y rara vez en secreciones genitales. Los anticuerpos neutralizantes se pueden detectar dentro de las 2 o 3 primeras semanas de la infección, persistiendo por varios años. (Vargas, 2013).

En ciertos casos del trabajo con estos virus resulta importante conocer cuál es la cantidad de virus aislada para preparar los sustratos celulares infectados para Inmunofluorescencia, ELISA, Inmunoperoxidasa o hibridización, entre otros, es decir el título de la suspensión viral.

## 2.2 Elaboración de vacunas

Las vacunas son preparados de antígenos destinados a generar inmunidad contra una enfermedad estimulando la producción de anticuerpo, las vacunas están formadas principalmente de dos componentes: los antígenos y los adyuvantes. (Escalante y col, 2012) Los antígenos son las moléculas que pueden ser reconocidas específicamente por los elementos del sistema inmunitario, previniendo la enfermedad. Los antígenos pueden estar formados a base de las mismas bacterias o virus. (Escalante y col 2012) Los adyuvantes son productos químicos o biológicos que, administrados con el antígeno son capaces de moderar la liberación de los antígenos, ayudando a optimizar la respuesta y reforzando la actividad de inmunidad, de forma inespecífica, la respuesta inmunitaria a dicho antígeno. (Morris y col, 2000) Por lo general los adyuvantes más ampliamente utilizados en las vacunas veterinarias son las emulsiones de aceite mineral (del tipo aceite en agua o agua en aceite) y los adsorbentes (hidróxido y fosfato de aluminio). (Morris y col, 2000)

El alumbre es un tipo de sulfato doble compuesto por el sulfato de un metal trivalente de aluminio  $K Al_3 (OH)_6 (SO_4)_2$ , a pH ácido o básico son insolubles; a pH 7.4 junto con líquido intersticial comienzan la solubilidad, favorecida de ácidos plasmáticos, cítrico, láctico, málico, etc., para llevarse a cabo una lenta liberación del antígeno. (Blanco y Cambroner, 2000)

La elaboración de una vacuna se deben seguir tres pasos fundamentales: La producción de antígeno, la formación del antígeno y el envasado del antígeno. Mientras que el proceso de fabricación de la vacuna comprende los siguientes pasos:

Inactivación: se trata de hacer de la preparación de antígeno

Purificación: el antígeno aislado es purificado

Formulación: el antígeno purificado se combina con adyuvantes, estabilizantes y conservantes para formar la preparación de la vacuna final. La inmunidad generada por las vacunas, es similar a la originada por las enfermedades: la vacunación desencadena una respuesta humoral y celular del organismo, mediante la formación de anticuerpos que van actuar neutralizando o facilitando la fagocitosis de los agentes infecciosos específicos (Santos, 2012).

La inmunidad generada por las vacunas, es similar a la originada por las enfermedades: la vacunación desencadena una respuesta humoral y celular del organismo, mediante la formación de anticuerpos que van actuar neutralizando o facilitando la fagocitosis de los agentes infecciosos específicos. (Ananya, 2012)

### **2.3 Técnicas inmunológicas (Seroneutralización, ELISA, Inmunoperoxidasa)**

La respuesta del organismo a una vacunación o exposición de campo con el agente se puede realizar mediante pruebas serológicas de laboratorio utilizando suero del paciente o, se puede evaluar en el laboratorio mediante la detección de anticuerpos específicos en el suero, utilizando antígenos conocidos antes y semanas después de la aplicación de la vacuna. El análisis cualitativo y cuantitativo se realiza mediante el empleo de técnicas inmunológicas basadas en la detección y evaluación de la respuesta humoral (anticuerpos y complemento) o celular (linfocitos T y fagocitos). (Rojas, 2006)

La inmunofluorescencia (IF) es un método sencillo para la identificación de un virus. La detección y cuantificación de anticuerpos antivirales se realiza mediante técnicas como la inhibición de la hemoaglutinación (HI), ELISA (Inmunoensayo unido a enzimas) neutralización de virus, fijación del complemento (FC), detección directa del virus por microscopia electrónica (ME) y la identificación del virus por microscopia Inmuno-electronica (MIE). (Bellanti, 2012)

La técnica de suero- neutralización (SN) consiste en una prueba punto final neutralizante, que permite identificar y cuantificar la capacidad de los anticuerpos séricos para inhibir o neutralizar el efecto citopático de una cepa dada. La mayor parte de las pruebas de neutralización se realiza en micro placas de fondo plano, estériles, desechables y atóxicas, la mezcla virus suero se añade sobre las monocapas para observar la neutralización del mismo. La prueba puede realizarse en dos formas:

- Método alfa. Se usa virus más suero diluido de forma constante en un volumen igual de soluciones ante diluciones décuples del virus. Este método identifica virus.
- Método beta. Utiliza un anticuerpo más virus diluido de forma constante, generalmente con 100 a 200 unidades, ante un volumen igual de diluciones dobles del anticuerpo. Este método mide el título de anticuerpos. (Lemuel, 2013)

El método Inmunoenzimático (ELISA) para la detección de anticuerpos, se utiliza para la cuantificación de muy pequeñas cantidades de estos, que habitualmente no son detectables por lo métodos convencionales; además esta técnica presenta la característica de una alta especificidad y sensibilidad. Su cuantificación se basa en la reacción enzima-sustrato que produce un cambio de coloración que se evalúa mediante un espectrofotómetro lo que evita resultados subjetivos. (Reinhardt, 2001)

La técnica de Inmunoperoxidasa es un método inmunoenzimático que ha permitido definir la respuesta de anticuerpos contra el virus, evidenciar la presencia del mismo y también ha sido ampliamente utilizada para titularlo. (Herrero, 2004)

## **2.4 Vacuna de Herpesvirus Canino**

En Europa existe una vacuna de Merial (Eurican Herpes 205), destinada a proteger a los recién nacidos de la afección neonatal. Debe administrarse a la perra gestante, para aumentar de manera importante el índice de anticuerpos neutralizantes en el calostro, con el fin de prevenir en los cachorros la mortalidad, los signos clínicos y las lesiones causadas por la herpes virosis canina contraída durante los primeros días siguientes al nacimiento. La vacuna se compone de antígenos del Herpesvirus canino (cepa F205) 0,3 a 1,75  $\mu$  (expresados en  $\mu$ g de glicoproteínas gB) con aceite ligero de parafina, trazas de gentamicina sulfato y trazas de tiomersal. (EPAR, 2007)

### 3. ANTECEDENTES

El Herpesvirus Canino se investigó en tres estudios en México. En uno de los estudios se determinó la prevalencia de anticuerpos contra CHV-1 en perreras caninas en el área metropolitana de la ciudad de México. (Valdivia y col, 2016) En otro, se presentó la descripción de la patología, el aislamiento y la identificación del Herpesvirus canino (CHV-1) en México. (Valdivia y col, 2016) En el último estudio se evaluó el efecto inmunoestimulador e inmunoregulador del compuesto ADIMOD frente al Herpesvirus canino en cachorros de una y dos semana de vida, como un método para prevenir la enfermedad y la pérdida de camadas. (Valdivia y col, 2016)

En el primer estudio se demostró mediante la técnica de ELISA que el 87% de la población estudiada prevalece el HVC-1, y 20 de las muestras, tomadas aleatoriamente, se detectaron anticuerpos neutralizantes para dicho virus. (Valdivia y col, 2016) En el segundo estudio, realizado en cachorros que murieron en las primeras cuatro semanas de vida presentaban lesiones constantes con Herpesvirus canino como: hemorragia petequiral y equimótica en riñones, hígado y pulmones; nefritis intersticial proliferativa; necrosis multifocal en hígado y riñones; y encefalitis con cuerpos de inclusión intranucleares. El Herpesvirus fue confirmado a través de inmunofluorescencia directa, microscopia electrónica y la reacción en cadena de polimerasa del DNA para los genes de la polimerasa y de la glicoproteína B. Este trabajo representa el primer informe de esta enfermedad, incluyendo lesiones gruesas e histológicas, y la confirmación por el aislamiento y la identificación del Herpesvirus canino en México. (Valdivia y col, 2016) El último estudio realizado con Adimod™ demostró que tiene un mayor efecto en la actividad fagocítica y genera una respuesta inmune más elevada relacionada con el aumento de la fagocitosis. Además, el nivel de anticuerpos neutralizantes fue mayor y aumentó más rápidamente cuando se usó Adimod™. (Valdivia y col, 2017)

Por otra parte, la vacuna Eurican Herpes 205, elaborada en Europa se estudió en cinco trabajos de investigación (tres de laboratorios y dos de campo) que comparados con la ausencia de vacunación (controles) demostró tener una buena protección, más del 80% de los cachorros de perras vacunas sobrevivieron. El Comité de Medicamentos de Uso Veterinario (CVMP) aprobó la vacuna Eurican Herpes 205 porque los beneficios son mayores que sus riesgos para la inmunización de perras sanas frente a Herpesvirus canino.

#### **4. HIPÓTESIS**

Si la administración de una vacuna experimental contra herpes virus canino es eficaz deberá mostrar una respuesta inmune de estimulación de anticuerpos en el modelo animal, que se podrá evaluar con técnicas inmunológicas como Seroneutralización, ELISA e Inmunoperoxidasa

#### **5. OBJETIVOS**

##### **5.2 Objetivo general**

Desarrollar una vacuna inactivada con adyuvante a partir de una cepa de Herpesvirus canino aislada en México.

##### **5.3 Objetivos específicos**

Elaborar una vacuna experimental de Herpesvirus canino inactivado.

Determinar las características de inactividad y esterilidad del producto desarrollado.

Demostrar la inocuidad del producto desarrollado.

Evaluar la respuesta inmune, con ELISA, Inmunoperoxidasa y Seroneutralización, en los conejos inoculados.



## **6. JUSTIFICACIÓN**

Debido a la evidencia diagnóstica de la presencia del Herpesvirus canino en México, con una mortalidad entre el 90 y 100% de las camadas, los cachorros que llegan a sobrevivir son portadores del virus en forma latente. Al afectar los criaderos de perros de razas puras, se pierden entre \$10,000 a 40,000 por cachorro. En México no existe vacuna para evitar la afección y la importación de la vacuna no garantiza la protección contra los serotipos prevalentes en México, además de que el costo por dosis sería aproximadamente de 500 a 800 pesos. Este trabajo propone el desarrollo de un producto biológico inactivado de Herpesvirus canino (vacuna experimental), para la prevención de la enfermedad y disminuir las pérdidas financieras en los criaderos.

## **7. METODOLOGÍA**

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 3 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM) en salud animal, de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

### **7.1 Elaboración de la vacuna experimental de HVC**

#### **7.1.1 Preparación del inóculo de HVC**

Los viales de Herpesvirus canino caracterizado fueron proporcionados por el Dr. Guillermo Valdivia, obtenidos del proyecto impulsado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT).

Se tomó 1 mL de cada abasto viral de HVC: “Cobos” y “17H”, obtenidos a partir de la membrana corioalantoidea de embriones de pollo, a estos se les adicionó 2 mL de PBS 1x pH 7.2, y se filtró por membrana de 0.22  $\mu\text{m}$ . De la mezcla anterior se tomaron 2 mL para la inactivación y preparación de la vacuna experimental y los 2 ml restantes se conservaron en congelación.

#### **7.1.2 Inactivación del virus mediante Ac. Ascórbico-Cu (II)**

La inactivación viral se realizó con ac. ascórbico 10mM y la solución de Cu (II) 1 mM, concentraciones recomendables para la inactivación de Herpesvirus descritas por la Dr. Betanzos, 2004.

La solución stock de ac. L-ascórbico 100mM se preparó en 100ml del Buffer de Tris-HCl 100mM pH 7.5, estéril. La solución de Cobre se preparó a una concentración de 10mM con sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) en agua desionizada.

A 2 mL de la suspensión de HVC se adicionó 14 mL de Tris-HCl pH 7.5, 2 mL de ac. L-ascórbico 100 mM y 2 mL de  $\text{CuSO}_4$  10 mM. Se incubó por una hora en refrigeración y se filtró por una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$ , a esta suspensión se etiquetó como HVCi (i:inactivado).

### **7.1.3 Preparación del inoculo experimental**

Se llevó acabo de acuerdo al manual de técnicas del Laboratorio DiVet®, de la siguiente manera:

Se disolvieron 40mg de alumbre en 5ml de HVC-i, se adicionaron 2 gotas de la solución saturada de NaOH para emulsificar y se aforó a 10ml con agua destilada. Se ajustó el pH de 6.5 a 7.5 con HCl; se envaso y etiqueto como “HVCi + Adyuvante”, siendo esta suspensión la vacuna experimental. Adicional a la suspensión anterior, se realizó otra con 40mg de alumbre en 5ml de agua destilada y 2 gotas de NaOH saturada, una vez formada la suspensión se aforo a 10 ml con agua destilada, se esterilizo, envaso y etiqueto como “Emulsión” (testigo negativo). Por último se preparó una solución con 5ml del HVC-i y 5ml de PBS 1x pH 7.2, en esterilidad se envaso y etiqueto como “HVC-i + PBS 1x”.

A las tres suspensiones obtenidas se les realizo prueba de esterilidad en agar sangre y se almacenaron en refrigeración a 5°C hasta que la prueba de esterilidad arrobara datos negativos a cualquier crecimiento microbiológico.

Se sembraron cajas de cultivo con la línea celular MDCK, inoculados con 1ml de la mezcla de virus antes de inactivar, con 1m del virus inactivado, con 1ml de Herpesvirus de delfín (HVD) y con medio de mantenimiento, por caja, para evaluar los efectos sobre las células.

En la producción de la vacuna experimental, después de la inactivación del virus y después de obtener las soluciones experimentales a inocular, siempre se llevó a cabo una filtración esterilizante con membranas de nitrocelulosa de 0.22 µm para eliminar eventuales contaminaciones de la solución.

### **7.1.4 Inoculación del producto biológico experimental**

Los animales fueron mantenidos en las instalaciones del Laboratorio DIVET® bajo la norma de cuidado y manejo de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999), que se llevan a cabo internamente en el Laboratorio, fueron alimentados con alimento comercial Purina y agua ad libitum, en jaulas especiales para este tipo de animales y en condiciones

de hábitat tipo bioterio. Además, siempre fueron inoculados con un producto totalmente inactivado.

Los animales fueron obtenidos de la granja de la FES-C y consistieron de 10 conejos de la raza Nueva Zelanda Blancos, de aproximadamente 1.9 a 2 Kg de peso, fueron divididos al azar en 3 grupos, se mantuvieron en observación por 72 horas, se les realizaron exámenes clínicos y exámenes hematológicos para asegurar su estado de salud y permitir la adaptación a las jaulas empleadas para su cautiverio.

Diariamente se realizó la observación macroscópica de los conejos, así como la revisión de signos clínicos. Al finalizar el proyecto se realizó la necropsia a los conejos utilizados, con el objetivo de observar efectos en los órganos internos sugestivos del efecto del Herpesvirus.

El cuadro 7.1 se describe la distribución de los animales por lote, así como la administración de las suspensiones experimentales con fechas y dosis.

**Cuadro 7.1 Resumen del diseño experimental de inmunización en el modelo**

Grupo	No de conejos	Identificación de conejos	Administración
A	4	1, 2, 3 y 4	1ml de “HVCi + Adyuvante”
B	4	5, 6, 7 y 8	1ml de “HVCi + PBS”
C	2	9 y 10	1ml de “Emulsión”

Nota. Se realizaron 2 inoculaciones al iniciar el experimento (29 de Oct. del 2015) y la 2da 21 días después (19 de nov de 2015).

## 7.2 Detección de IgG de conejo mediante la técnica de Seroneutralización

### 7.2.1 Determinación del título viral de HVD

Se realizaron diluciones decimales del Herpesvirus de Delfín (HVD) cepa 001 en medio MEM al 2% de suero de ternero neonato (STN). Las cuales se colocaron por pozo en la placa de células como lo muestra en el cuadro 7.2.

Cuadro 7.2 Modelo experimental para la titulación de HVD en células MDBK.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Virus directo	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup>	Testigo (-)
<b>B</b>	Testigo (-)	Testigo (-)	Testigo (-)	testigo (-)	testigo (-)	testigo (-)	testigo (-)	testigo (-)	testigo (-)	testigo (-)	testigo (-)	Testigo (-)
<b>C</b>	Virus directo	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup>	Testigo (-)

Nota. Placas de 96 pozos con A y C con 100 µl de virus directo y de sus diluciones decimales y B con 100µl de medio de mantenimiento (filas alternadas).

Para la titulación de HVD se prepararon cajas de 96 pozos con células MDBK con un 85% de confluencia. Se les retiró el medio de cultivo de los pozos y se enjugaron dos veces con PBS, se inocularon 100 µl de cada dilución del virus en cada fila intercalada y 200 µl de medio MEM 2% a la fila de células testigo. Se incubó a 37 °C durante 1 hora, se reconstituyó con 100 µl de medio MEM 2% a las filas que contenían el virus. Se incubaron a 37°C de 48 a 72 horas con observación microscópica diaria hasta ya no detectarse lisis celular en los pozos (5 días aproximadamente). Se decantó suavemente el medio y se fijó con acetona fría. Se tiñó con cristal violeta al 0.02% y se observó al microscopio para determinar el título viral.

### **7.2.2 Inactivación del suero problema**

En una placa de 96 pozos previamente limpia y estéril se colocó 100 µl de medio MEM al 2% en los pozos de la columna 3 a la 12. Se colocó 200 µl de suero problema en los pozos de la columna 2 y 100 µl en la columna 3. A partir de la columna 3 se realizaron las diluciones dobles de izquierda a derecha, homogenizando suavemente. Posteriormente se dejó la placa expuesta a la luz uv por 30 min. Se adicionó 100 µl de virus a los pozos de las columnas 3 a la 11, se dejaron incubar 1 hora a 35°C.

### **7.2.3 Técnica de Seroneutralización**

Para la titulación se prepararon cajas de células MDBK con confluencia en un 85-90%. Se les retiró el medio de cultivo de los pozos y se enjugaron dos veces con PBS 1x. Se utilizó la columna 12 como testigo negativo. A los pozos de la columna 1 se adicionaron 200 µl de virus HVD cepa 001  $10^{-4}$ . A partir de la columna 2 se fueron pasando las diluciones del suero-virus a las células realizadas en la placa de inactivación. Se agitó suavemente la placa y se incubó a 35 °C por 5 días, cuando ya no se observó más lisis celular en los pozos de la placa al microscopio. Se montaron los sueros problema con virus directo y las diluciones del virus [1:20] (50 partículas virales/ml) y [1:40] (25 partículas virales/ml).

## **7.3 Detección de IgG de conejo mediante la técnica de Inmunoperoxidasa**

Siguiendo el protocolo para Seroneutralización se montaron placas de 96 pozos con los sueros con suficiente cantidad y con la dilución de HVD 001 [1:40]. Al tercer día de incubación se fijaron las placas con acetona fría, hasta realizarse la técnica de Inmunoperoxidasa. Se rehidrató con solución buffer tris (TBS) pH 7.6 por 5min. Se incubó en cámara húmeda con peróxido de hidrogeno al 0.6% en metanol al 80%, por 15 min a 37°C. Se lavaron 3 veces por 5 minutos con TBS a temperatura ambiente. Se colocó 100 µl de anti IgG Conejo peroxidado diluido (1:200) con PBS. Se incubó 1 hora en cámara húmeda a 37°C. Se lavó 3 veces por 5 min con TBS a temperatura ambiente. Se colocó diaminobenzidina por 10 min. Se lavó con agua destilada y contrastó con hematoxilina de

Harris por 15 min. Por último se lavó con agua destilada y con agua corriente, se dejó secar y se colocó medio de montaje para su observación al microscopio.

## **7.4 Detección de IgG de conejo mediante la técnica de ELISA.**

### **7.4.1 Sensibilización de la placa**

En micro placas de poliestireno de 96 pozos con fondo plano se colocó 50 µl de virus (HVD) obtenido en cultivo celular de la línea MDBK y 50µl de células MDBK; alternando las columnas. Se adicionó 50 µl de solución de carbonato-bicarbonato en cada pozo y se incubó a 4°C durante toda la noche. Se decantó la placa y se lavó dos veces con solución de lavado y una vez con agua destilada y dejó secar sobre un papel absorbente.

### **7.4.2 Bloqueo de la placa**

Bloqueo de la placa. Se agregan 150 µl de la solución de leche descremada al 10% y 150 µl de solución de carbonato-bicarbonato y se incubó a 4°C toda la noche. Se lavó y secó la placa al siguiente día de manera ya descrita.

### **7.4.3 Prueba de ELISA**

Se eligió un pozo con virus y uno con células para cada suero problema, se agregó: 50 µl del suero problema con concentración [1:2] con PBS 1x, 50 µl de suero de conejo sano, y 50µl de un Pool de suero de conejo con contra HVD. Se incubó durante 1 hora a 37°C. Se decantó la placa y se lavó dos veces con solución de lavado y una vez con agua destilada, y se dejó secar sobre papel absorbente. A cada pozo se le adicionó 100 µl de conjugado de conejo diluido 1:100 en PBS 1x y se incubó a 37°C durante una hora y se lavó la placa, como ya se mencionó. Se adicionó 100 µl de la solución desarrolladora de color (preparada al momento) a cada pozo. Se incubó en oscuridad durante 15 minutos. La reacción se paró con 50 µl de solución de paro. Se leyó en el lector de Elisa a 490 nm.

En el cuadro 7.3, se visualiza los sueros utilizados para la técnica de ELISA, así como su localización en la placa de ELISA.

*Cuadro 7.3 Modelo de montaje de la placa de ELISA*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	CO2-S2		CO10-S2		CO8-S4		CO7-S5		Mezcla de conejo	
B	CO1-S2		CO9-S2		CO7-S4		CO6-S5		Mezcla de conejo	
C	CO10-S1		CO8-S2		CO6-S4		CO4-S5		Conejo sano	
D	CO9-S1		CO7-S2		CO3-S4		CO3-S5		CO9 Sin inoculación	
E	CO7-S1		CO6-S2		CO10-S3		CO2-S5		CO7 Sin Inoculación	
F	CO5-S1		CO5-S2		CO5-S3		CO1-S5		CO10-S5	
G	CO4-S1		CO4-S2		CO2-S3		CO4-S4		CO9-S5	
H	CO3-S1		CO3-S2		CO1-S3		CO9-S4		CO8-S5	
	Virus	Células	Virus	Células	Virus	Células	Virus	Células	Virus	Células

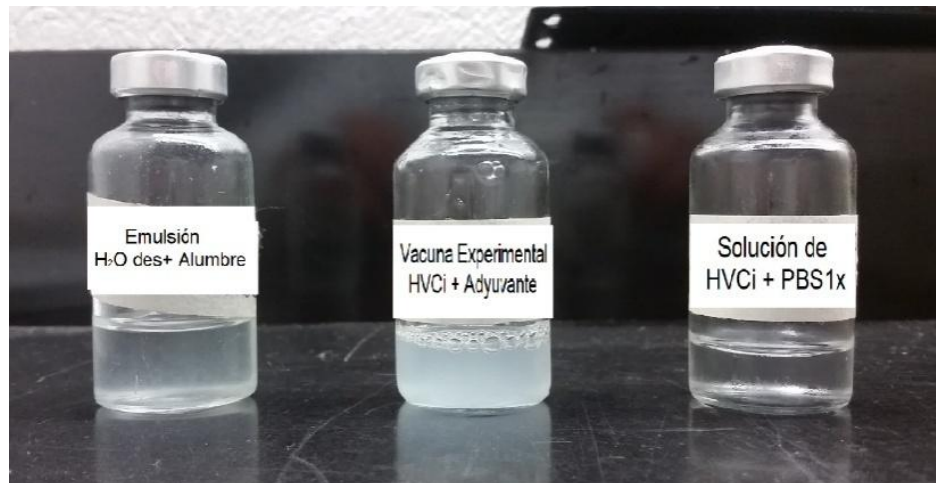
Nota. Se colocaron: 50 µl de virus y 50 µl de células, se adicionó 100 µl de suero problema y 100 µl de conjugado. \*CO: conejo, S: *semana*.



## 8. RESULTADOS

### 8.1 Elaboración de la vacuna experimental

El abasto viral de Herpesvirus canino perteneciente al cepario del Laboratorio de Patogenicidad microbiana de la FESC el cual se obtuvo de siembras en embriones de pollo, fue proporcionado por el Dr. Guillermo Valdivia. Se obtuvieron tres viales de suspensiones; dos con el virus inactivado: HVCi + Adyuvante (vacuna experimental), HVC-i + PBS 1x, y uno con H<sub>2</sub>O destilada más alumbre (Emulsión); las tres soluciones se filtraron con membranas Millipore de 0.2 µm de diámetro, Figura 8.1.



*Figura 8.1 Suspensiones experimentales: a) Emulsión: H<sub>2</sub>O des + Alumbre, b) Vacuna: HVCi+Adyuvante, y c) Solución de HVCi+PBS1x.*

En cajas de agar sangre sembradas con cada una de las soluciones anteriores, revisadas del día tres al cinco no se observó desarrollo de microorganismos. En los cultivos celulares sembrados junto con un control negativo (células y medio de mantenimiento) no se observó cambios citopáticos o lisis celular, por el contrario, en la caja control positivo, con virus sin inactivar, se observó destrucción celular, así como racimos de las células, cambios característicos del HVD, estos efectos se presentan en la figura 8.2. Por lo tanto, se procedió a la inoculación de las suspensiones en el modelo animal. En la figura 8.3 se observa el grupo de conejos distribuidos de acuerdo al diseño experimental.

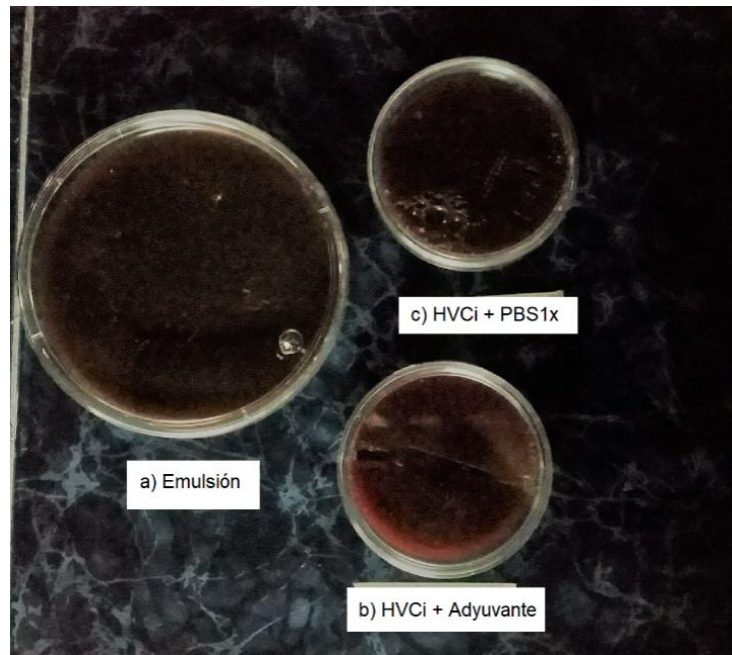


Figura 8.2 Cajas de cultivo de agar sangre sembradas con las soluciones experimentales: a) Emulsión, b) HVCi+Adyuvante y c) HVCi+PBS1x.



Figura 8.3 Distribución del modelo animal. Agrupación de acuerdo a la suspensión administrada: a) Lote A: HVCi Adyuvante, b) Lote B HVCi+PBS1x y, c) Emulsión.

No se observaron signos clínicos por la inoculación de las disoluciones en la semana 1, 2 y 3. En la semana 4 se volvió a inocular a los conejos, pero estos no mostraron cambios significativos por las disoluciones inoculadas. Al día 22 se observó en dos conejos (conejo 5 del lote B y el conejo 9 del lote C) disminución de peso y diarrea; se les realizó un estudio de heces al cual salieron positivos a coccidias. Se les administró el tratamiento con sulfas, pero el conejo 5 al cuarto día de tratamiento falleció. El resto de los conejos se muestrearon sin dificultad hasta la última semana del ensayo. Obteniéndose 39 sueros de conejo post inoculación y 10 antes de la inoculación. En la necropsia realizada tanto al conejo 5 después de su muerte como a los demás conejos no se observaron cambios en los órganos internos atribuibles al producto empleado. La necropsia fue realizada con el apoyo de un veterinario con conocimiento en cambios patológicos de órganos.

Para poder evaluar la respuesta inmunológica humoral generada por el producto biológico (HVCi más Adyuvante) se realizaron las pruebas de Seroneutralización, ELISA e Inmunoperoxidasa.

## **8.2 Detección de IgG de conejo mediante la técnica de Seroneutralización**

### **8.2.2 Determinación del título viral de HVD**

En verificación del título viral, los pozos control negativo (fila A, C, E y G) mostraron células sin cambios microscópicos visibles, con un buen crecimiento, núcleo redondeado y delimitado (Figura 8.4).



Figura 8.4 Control negativo células MDBK 95% de confluencia, teñidas con cristal violeta.

Mientras que, a los pozos inoculados con las diluciones virales, mostraban lisis celular decreciente hasta llegar al pozo donde las células no mostraban efecto del virus (Figura 8.5)

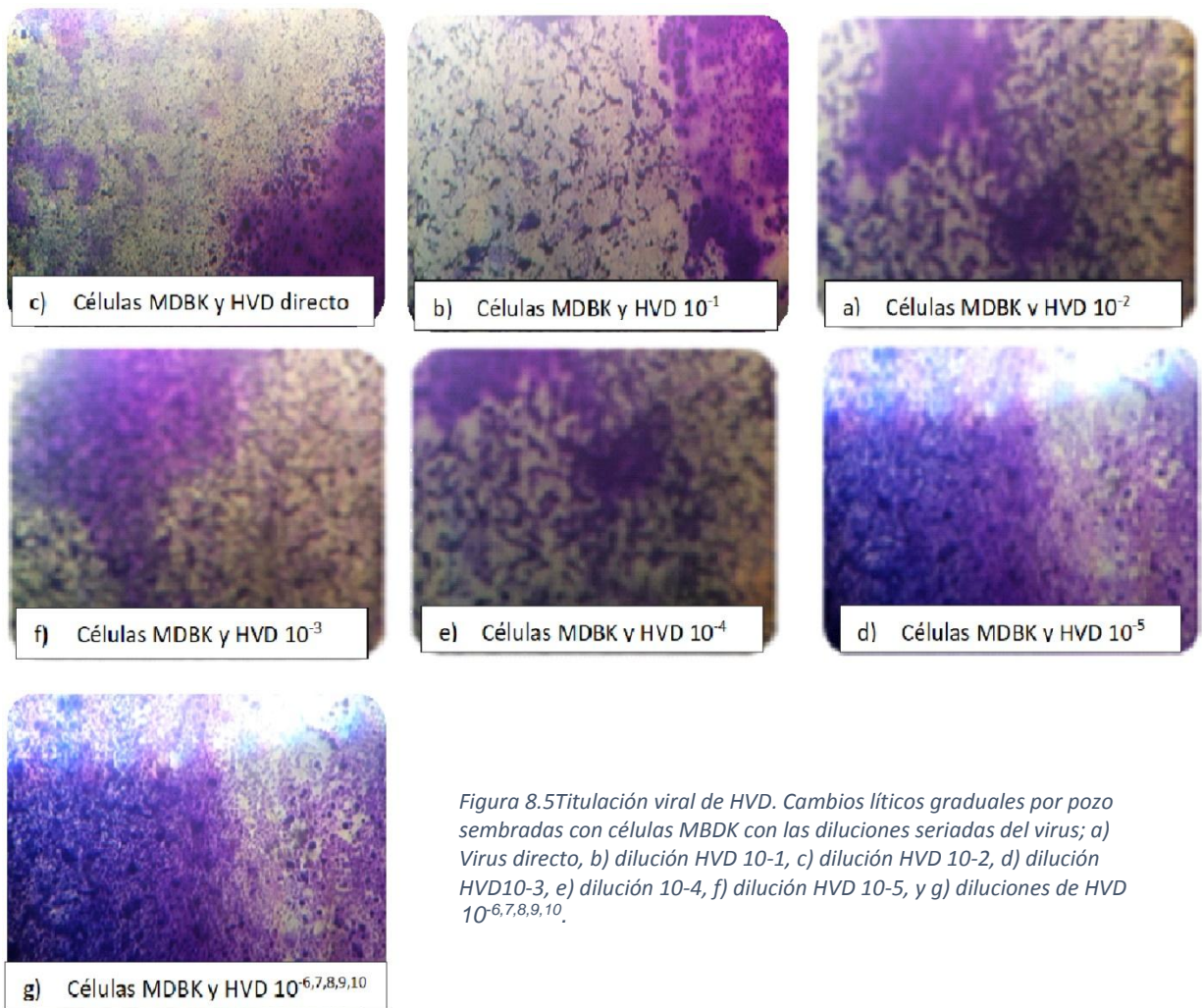


Figura 8.5 Titulación viral de HVD. Cambios líticos graduales por pozo sembradas con células MBDK con las diluciones seriadas del virus; a) Virus directo, b) dilución HVD 10-1, c) dilución HVD 10-2, d) dilución HVD 10-3, e) dilución 10-4, f) dilución HVD 10-5, y g) diluciones de HVD 10-6,7,8,9,10.

En la figura 8.6 se observa macroscópicamente la placa de titulación de células MDBK con las diluciones seriadas del HVD, teñidas con cristal violeta.

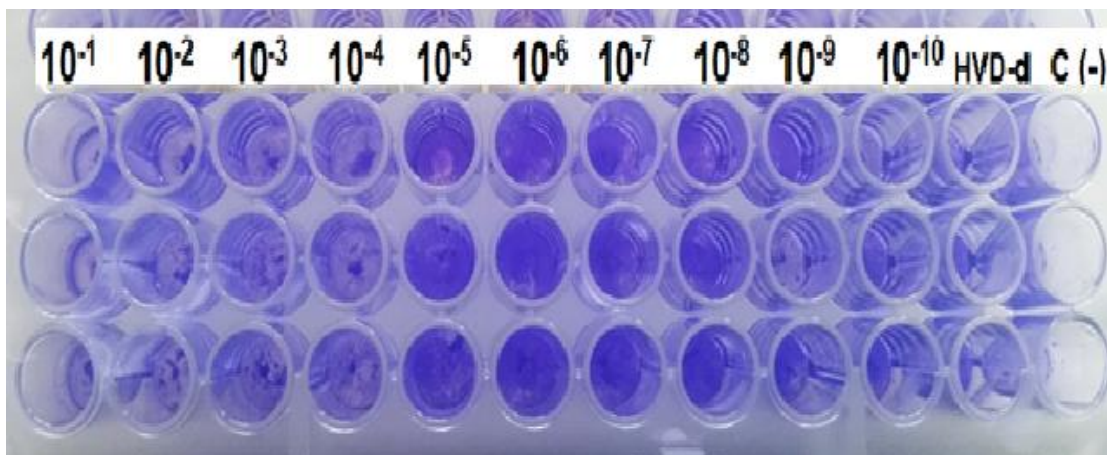


Figura 8.6 Placa de titulación de HD y diluciones del mismo en células MDBK teñida con cristal violeta

## 8.2.2 Técnica de Seroneutralización

### 8.2.2.1 Evaluación de los pozos testigos (negativo y positivo)

#### a) Pozos testigo negativo (células con medio MEM al 2% STN).

Las células previstas para controles negativos y aseguramiento de todas las pruebas montadas no mostraron cambios celulares, ni afectaciones de lisis o destrucción por el contrario se aumentó su confluencia (figura 8.7a).

#### b) Pozos testigo negativo (inoculados con suero problema).

Los pozos con suero tenían una confluencia celular del 85 al 95 %, sin cambios morfológicos, durante los 5 días de la experimentación (Figura 8.7b).

#### c) Pozos testigo positivo (inoculados con HVD 10-4, [1:20] y [1:40])

En todos los pozos de la placa se observó la destrucción celular al 1er día de la prueba (Figura 8.7c).

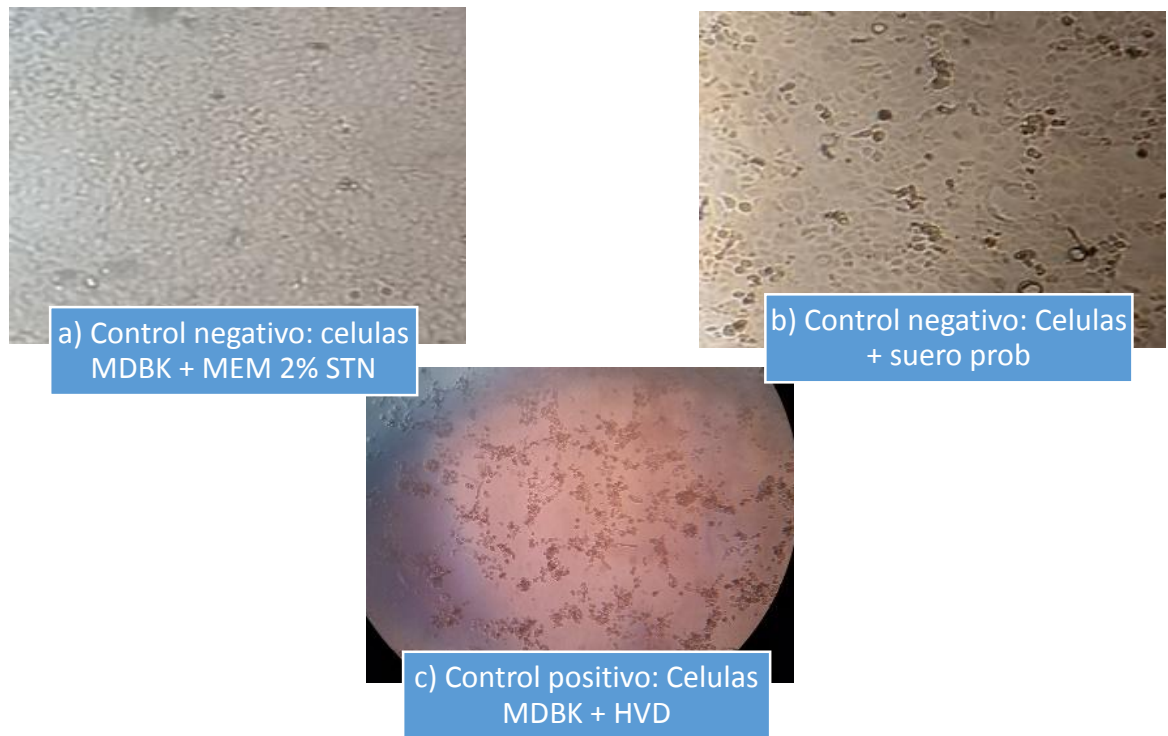


Figura 8.7 Controles de la Técnica de Seroneutralización. a) Control negativo: células MDBK + MEM 2% STN, b) Control negativo: Células + suero prob y c) Control positivo: Células MDBK + HVD.

#### 8.2.2.2 Pozos inoculados con diluciones dobles de suero

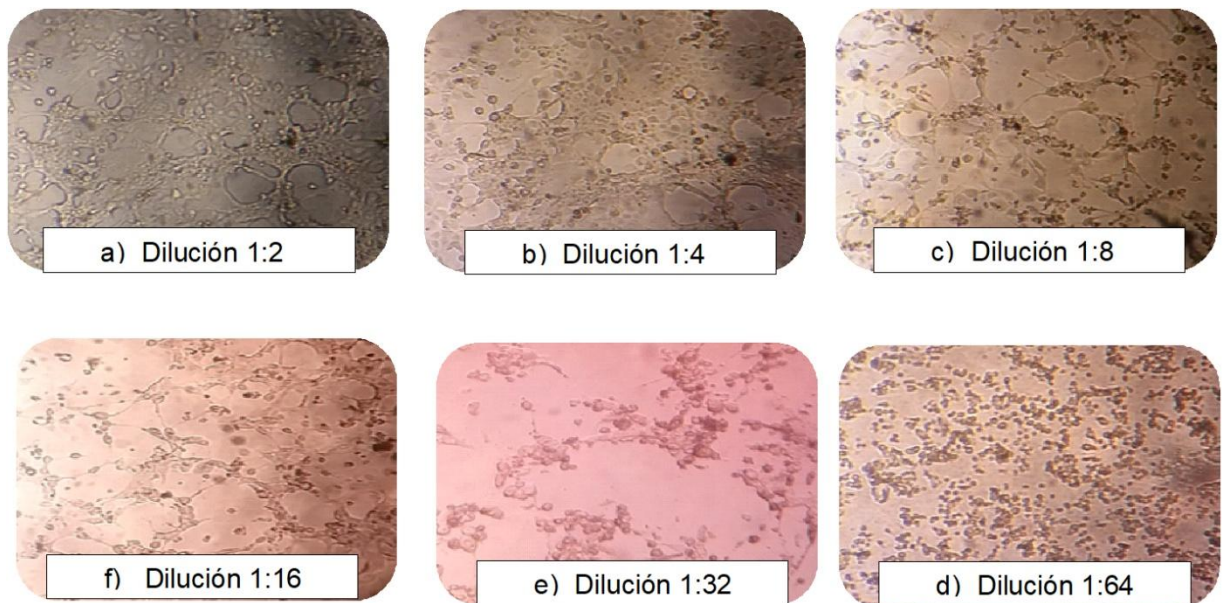
##### a) Con 25 partículas virales/ml de HVD

El día 1 y 2 los pozos no mostraron cambios importantes, viéndose aparentemente sin efecto del virus. A partir del día 3 en los primeros pozos (columnas 3, 4, 5, 6, 7 y 8) con mayor concentración de suero se observó alargamiento de las células, los cambios aumentaban conforme se avanza en las columnas mientras que los pozos restantes (9, 10 y 11) había muerte celular, celular redondas, desprendidas, y fragmentos de células. El día 5 todos los pozos mostraron muerte celular, independientemente de la concentración de suero.

**b) Con 50 y 1000 partículas virales/ml de HVD**

Los efectos citopáticos se notaron a partir del primer día, siendo estos: alargamiento celular en su mayoría, formación de racimos celulares y por último el desprendimiento de las mismas y células redondas.

Los anteriores cambios morfológicos observados microscópicamente en los cultivos células de MDBK independientemente de la concentración de virus con las diluciones dobles del suero de conejo obtenido después de la inoculación de la vacuna experimental, se muestran en la figura 8.8.



*Figura 8.8 Efectos del virus sobre las células, técnica de Seroneutralización. Cambios líticos en células MDBK inoculadas con HVD [1:40] y diluciones dobles del suero de conejo.*

### 8.3 Detección de IgG de conejo mediante la técnica de Inmunoperoxidasa

En las placas de 96 pozos con células MDBK y los sueros de conejo se esperaba observar cúmulos color marrón, que evidenciaran la reacción antígeno-anticuerpo.

En las 5 placas montadas ninguna presento cúmulos marrones, todos los pozos mostraron células deformadas, y muerte celular de menor a mayor grado conforme disminuía la concentración de suero (Figura 8.9), las células grandes se observaron solo en los pozos donde se agregó el virus directo y la concentración de suero a partir de 1/32, 1/64, 1/128, 1/512 (figura 8.10). En escasos pozos se notaron sincitios celulares especialmente en los pozos con virus directo. Los pozos que solo contenían células más suero se observaron confluentes y sin cambios morfológicos.

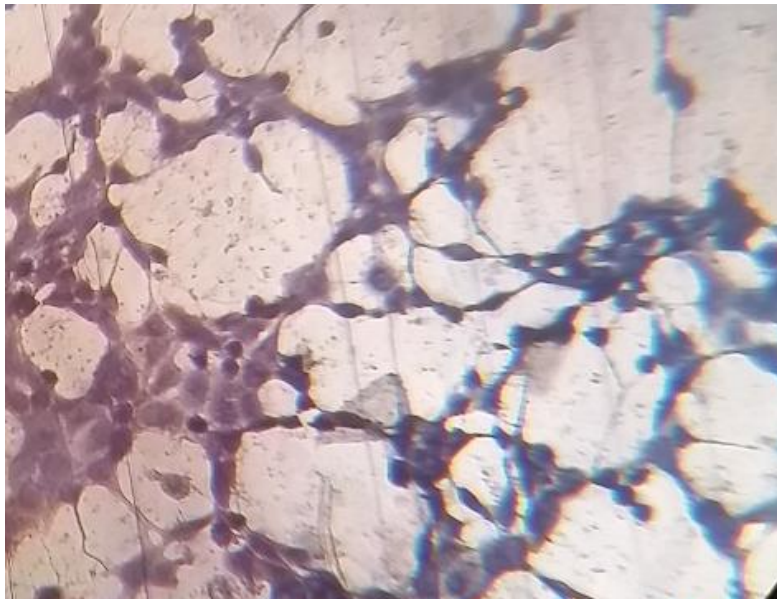
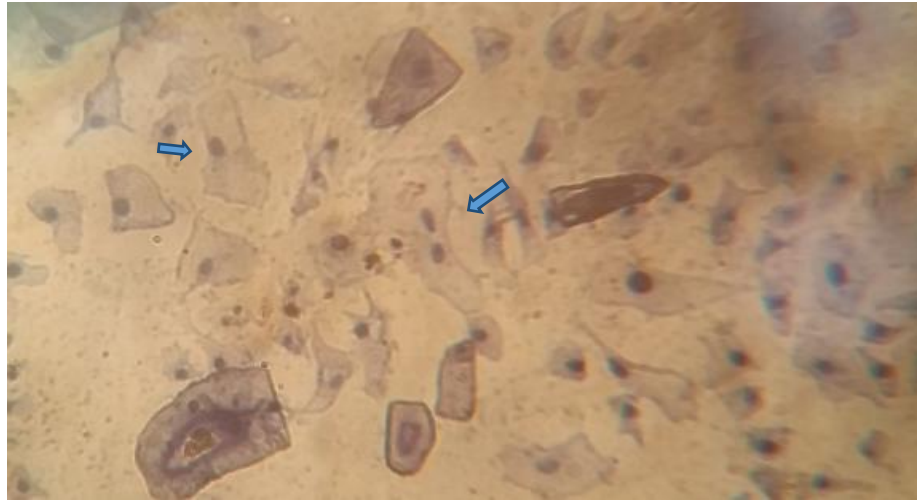


Figura 8.9 Efectos del virus en células MDBK, técnica Inmunoperoxidasa. Células en racimos por efecto del HVD [1:40]





*Figura 8.10 Células MDBK afectadas por HVD [1:40]. Flecha izquierda células gigantes, flecha izquierda sincitios celular, observadas en la técnica de Inmunoperoxidasa.*

#### **8.4 Detección de IgG de conejo mediante la técnica de ELISA.**

Con las absorbancias obtenidas en la técnica de ELISA, se agruparon de acuerdo a los grupos experimentales obtenidos, cuadro 8.4 y a las absorbancias positivas para HVD, cuadro 8.5. Cabe mencionar que las lecturas fueron solo para los sueros que a finalizar la parte experimental contaban con la cantidad suficiente del mismo para realizar la técnica.

Cuadro 8.4 Absorbancias de la Técnica de Elisa de los sueros obtenidos cada semana de experimentación, ordenados por lote y grupo experimental.

		SEMANA (ABSORBANCIA)					
		CONEJOS	1	2	3	4	5
Lote A	1			0.628	0.477		0.829
Vacuna	2			0.613	0.619		0.814
Experimental	3		0.021	0.624	0.863		0.896
	4		0.564	0.546		0.576	0.788
Lote B	5		0.906	0.889	0.914		
Virus inactivado en PBS	6			0.786		0.737	0.705
	7		0.718	0.653		0.727	0.649
Lote C	8			0.968		0.941	0.571
	9		0.807	0.708		0.537	0.549
Adyuvante	10		0.627	0.999	1.195		0.632
Conejo Sano			0.738				
Conejos 7 pre-inoculación			0.715				
Conejo 9 pre-inoculación			0.685				

Cuadro 8.5 Absorbancia y cálculo de diferencias de los sueros de la mezcla de conejo 1 y 2.

		Virus + MDBK	MBK	Diferencia
MEZCLA DE CONEJO 1	Suero con ac para virus y MDBK	1.122	1.082	0.04
MEZCLA DE CONEJO 2	Suero sin ac para MDBK	1.344	0.971	0.373

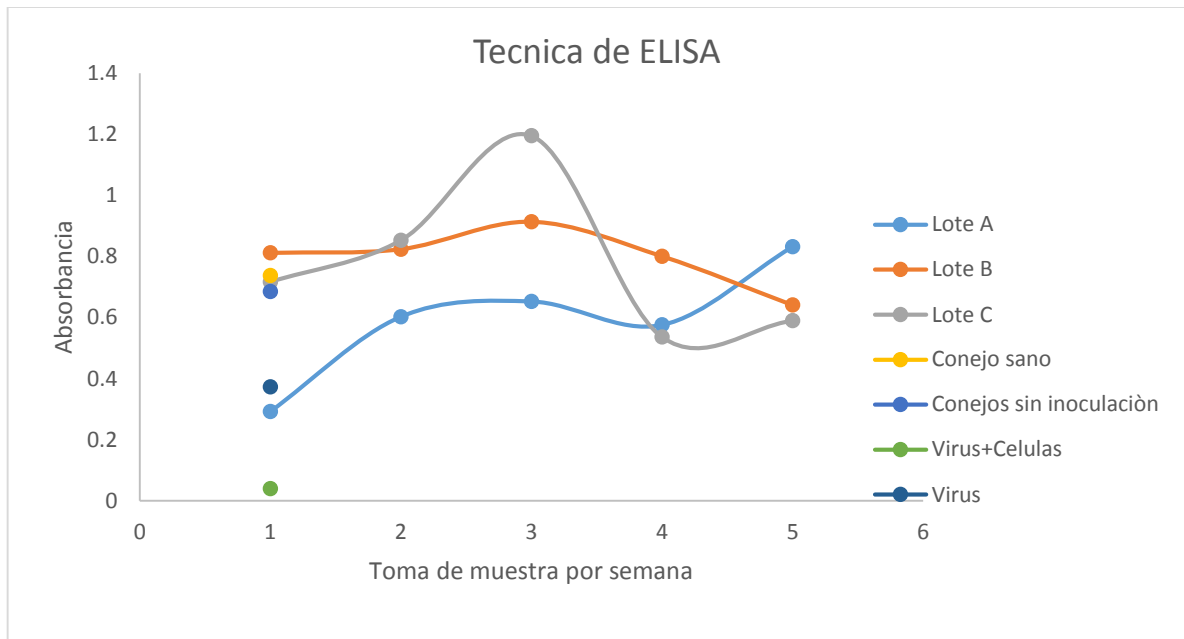
Posteriormente se graficaron las absorbancias promedio obtenidas de cada lote tabla 8.6, grafico 1, junto con los sueros de conejo, sano y sin inocular (conejo 7 y 9) y la absorbancia de la relación antígeno anticuerpo, HVD-ac (calculada con las mezclas de suero de conejo 1 y 2).

**Tabla8.6** Promedio de absorbancias por lote de cada semana de experimentación.

	Promedio de absorbancia				
	1ra Semana	2da Semana	3ra Semana	4ta Semana	5ta Semana
Lote A	0.2925	0.60275	0.653	0.576	0.83175
Lote B	0.812	0.824	0.914	0.801	0.641
Lote C	0.717	0.853	1.195	0.537	0.59

La mezcla de los sueros obtenidos del conejo 2 se utilizó como control positivo, la diferencia entre los pozos de células y células con virus nos arrojarían valores que indicaran muestras positivas para HVD, valores de entre 0.3 +/- 0.1 (Guzmán, 2015). Cabe mencionar que la mezcla de conejo 1 mostró tener gran cantidad de anticuerpos dirigidos contra las células donde se obtuvo el herpes virus de delfín, que pueden interferir en la lectura para detectar el virus específicamente.

Con el objetivo de demostrar presencia de anticuerpos IgG de conejo por cada lote experimental, se obtuvo los promedios de cada grupo y graficó (figura8.11)



**Figura 8.21** Absorbancias de los grupos experimentales por semana, los controles negativos y positivos de la técnica de ELISA.

## 9. DISCUSIÓN

La patología causada por la infección por Herpesvirus Canino provoca una disminución de éxito de reproducción de cachorros en criaderos, además de causar alteraciones en la fertilidad y fecundidad de las hembras (Krogenaes, 2014). En los últimos años, en México se ha detectado por serología, la presencia del virus en varios criaderos, por lo que el presente estudio está enfocado en el desarrollo de una vacuna experimental inactivada con adyuvante a partir de una cepa de Herpesvirus canino aislada en México.

La técnica de reproducción viral en embriones de pollo, es útil para diferenciar virus herpes simplex de algunos otros, por los sitios de infección en forma de placas, además de ser muy importante para la identificación y diferenciación de virus desconocidos (Merchant y Parker, 1980).

El método de inactivación mediante ácido ascórbico-Cu (II) como protocolo de inactivación consiste en causar la ruptura de los ácidos nucleicos sin modificar las proteínas del virión de miembros de la familia de Herpesvirus, así lo describe el Dr. Betanzos-Cabrera (Betanzos y col, 2004). El proceso consiste en reducir los puentes disulfuros de origen biológico por acción de radicales libres generados a partir del ácido ascórbico, ascorbato (radical hidroxilo) en presencia de trazas de metales como el  $\text{Cu}^{2+}$  (Troncoso, 1998). Cuando la concentración de ascorbato se encuentra por encima de 1 Mmol, en presencia de una concentración micromolar de  $\text{Cu}^{2+}$ , actúa como un pro oxidante incrementando considerablemente la oxidación de ácidos nucleicos (Troncoso, 1998).

En la titulación viral de HVD por punto final (Dosis-Respuesta) se mide la respuesta de acuerdo al efecto del virus sobre las células, y a la dosis respecto a la dilución de la muestra viral. Se usaron diluciones al décimo, y se trabajó con el  $\log_{10}$ , para conocer la máxima dilución que causa un 50% de lisis del cultivo celular y corroborar que la última dilución que ha dado efecto citopático positivo contiene una unidad viral infectiva ( $10^{-4}$ ). (Herrera, 2004).

La Seroneutralización evaluó el efecto protector de los anticuerpos neutralizantes obtenidos de los sueros de conejos inmunizados dirigidos específicamente contra antígenos de la superficie de Herpesvirus (en este caso Herpesvirus de delfín) sin embargo, no se mostró protección del suero en los cultivos celulares infectados. La Seroneutralización fue desarrollada con el suero de conejo problema y HVD por la dificultad de obtener un abasto viral suficiente para la “tipificación” e identificación de herpes virus canino en el laboratorio.

En los pozos testigo negativo (células más MEM 2% STN y sueros problema inactivados) no presentaron cambios morfológicos en células ni cambios en el medio de mantenimiento como turbidez, comprobando que los sueros problema se inactivaron correctamente, así como el buen manejo y manipulación de la células y reactivos. El uso de la luz UV en la inactivación del suero asegura la calidad de nuestro control negativo de suero, al descartar la contaminación de los sueros como de los materiales y reactivos a utilizar, así como de reacciones cruzadas entre proteínas incluidas en el suero con la neutralización del virus.

En los pozos testigo positivo inoculados con virus directo y sus diluciones se observaron los cambios morfológicos celulares característicos del HVD; en los pozos de prueba (virus y suero inactivado) se observaron efectos característicos del virus sobre las células, lo que nos demuestra que el suero inactivado problema no contenía anticuerpos neutralizantes dirigidos contra el Herpesvirus.

Otra técnica que demostró el complejo antígeno-anticuerpo ligado (HVD y anticuerpos dirigidos contra Herpesvirus) con anticuerpos específicos para conejo fue la técnica de Inmunoperoxidasa por el método indirecto. Esta técnica nos permitió detectar anticuerpos, enfrentando al antígeno con el anticuerpo no marcado, mediante un enlace covalente, y este complejo visualizarlo con una antigama-globulina marcada con un cromógeno, esta técnica se basa en el reconocimiento de un tejido con capacidad antigénica por un anticuerpo primario, al cual se une una o varias moléculas con actividad enzimática, sobre todo la peroxidasa de rábano, se debe añadir al tejido una solución con el sustrato de la enzima empleada, a la vez que una sustancia cromógena, que cambiará el color al producirse la reacción entre el sustrato y la enzima (Rodríguez, 2010). El agua oxigenada es el sustrato

que reacciona con la peroxidasa en las técnicas de Inmunoperoxidasa. Además de agua, en esta reacción libera oxígeno, el cual oxida sustancias como la diaminobenzidina que se transforma en insoluble y coloreada (Rodríguez, 2010). Este color se visualiza fácilmente con el microscopio óptico convencional, y sirve para identificar las áreas donde se ha producido la reacción antígeno-anticuerpo. Al observarse los pozos de las placas montadas para dicha prueba, ninguno mostraba precipitados marrones por el contrario se observó el efecto del virus sobre las células. Con esta prueba se determina que los sueros problema no contienen anticuerpos tipo IgG.

Por último, la técnica de ELISA tipo sándwich se realizó en placas de poliestireno, el cual favorece la reproductividad de la unión antígeno anticuerpo. Este tipo de ELISA detecta anticuerpos específicos (IgG de conejo) contra un reactante inmunológico conocido (Herpesvirus de Delfín), mediante el uso de un segundo anticuerpo marcado con una enzima (IgG de conejo, conjugado).

La primera vez que un antígeno se pone en contacto con el sistema inmune se produce una respuesta primaria. Tras un segundo encuentro la respuesta no es solo más rápida, sino que es también más intensa, más ávida y más afín (Fontán, 2005). Esto efecto se observa al ver la tendencia de absorbancias del Lote A. La absorbancia inicial de los conejos sin inocular se encuentran entre 0.3 y 0.4, de forma similar las absorbancias obtenidas una semana después de la primera inoculación se encuentran en dicho rango, pero para la semana 2 se nota un aumento significativo, cuando las absorbancias alcanzan un valor de entre 0.5 y 0.6, y manteniéndose ligeramente en aumento para la tercera semana (entre 0.6), para la semana 4 se observa un declive de la respuesta inmune al obtenerse bajas absorbancias; en esta semana se realizó la 2da inoculación. En la semana 5 se observó el aumento significativo de absorbancia. Cuando el aparato inmunológico detecta por segunda vez la presencia del mismo antígeno, origina una respuesta bastante distinta de la anterior: hay menos retraso entre la entrada del antígeno y la aparición de anticuerpos, siendo su producción mucho más rápida, los valores de concentración de estas IgG en la sangre son mayores y su persistencia en la sangre es muy superior (Asencio, 2010).

El lote B consistía en una suspensión de Herpesvirus canino inactivado y PBS1X; la tendencia que adquiere este lote es constante entre valores de 0.8 y 0.9 en las primeras 4 semanas, y disminuyendo después de la segunda inoculación.

El lote C (adyuvante en agua desionizada y estéril) mantiene valores entre 0.6 y 0.9, tiene un comportamiento similar al lote B, en la semana 3 se nota un incremento de absorbancia que no es de importancia, ya que los datos obtenidos en esa semana solo es uno.

Tanto los valores del lote B como del lote C, caen cerca del valor arrojado por el suero de conejo testigo negativo (suero de conejo sano y los sueros de conejo sin inoculación), al inicio de la experimentación, por lo tanto, no se considera relevante los datos arrojados por la técnica de ELISA.

Por otra parte la tendencia de la curva del lote A sugiere la producción de anticuerpos formados a lo largo del experimento, pero considerando las absorbancias de los conejos testigo negativo mayor a 0.7 y los valores de referencias para detectar HVD en cultivos celulares mediante la técnica de ELISA, descartan la posibilidad de producción de anticuerpos IgG formados en los conejos del lote A dirigidos al HVD.

De las 3 técnicas para evaluar la respuesta inmune producida por la vacuna experimental contra herpes virus canino, la técnica de Inmunoperoxidasa fue mejor para detección de anticuerpos, porque detecta cantidades menores y la unión entre dichos inmunógenos es de mayor especificidad y fuerza, mientras que la técnica diagnóstica de Seroneutralización presenta la limitante de no detectar bajas tasas de anticuerpos (Reinhardt y col, 2001) y la técnica de ELISA que se montó no hace diferencia específica contra una analito, en este caso el virus.



## 10. CONCLUSIONES

- Se logró desarrollar una vacuna experimental de virus inactivado y adyuvante, estéril e inocuo para conejos.
- La metodología empleada para diseñar la vacuna mostró un producto estéril y no tóxico para los conejos, al no presentarse reacciones adversas en el modelo animal.
- En la técnica de Seroneutralización se descartó la presencia de anticuerpos neutralizantes (clase IgG y/o IgM)
- En la técnica de Inmunoperoxidasa, no se observaron los cúmulos marrones que evidenciaran la reacción entre el IgG marcado específico con los anticuerpos de conejo, por el contrario se observó el efecto lítico de virus sobre las células, evidenciado así la nula presencia de anticuerpos de conejo contra Herpesvirus.
- Por otra parte la técnica de ELISA al igual que las anteriores técnicas no arrojaron datos sugestivos o indicativos de presencia de anticuerpos, pues todos los datos se encuentran por debajo de los testigos negativos.
- Las técnicas inmunológicas en conjunto utilizadas en este proyecto descartan la presencia de anticuerpo dirigidos a aun Herpesvirus perteneciente a la familia *Herpesviridae*.

## 11. PERSPECTIVAS

Determinar si el conejo puede ser empleado como modelo animal para estudiar Herpesvirus canino.

El producto desarrollado se deberá probar en perras para determinar su papel inmunogénico.

Mejorar los protocolos de obtención viral para Herpesvirus canino.

Probar otro tipo de adyuvantes que ayuden o mejoren la respuesta inmune.

## 12. BIBLIOGRAFIA

1. Acton y col. (2011). "Inoculación de virus en huevos embrionados." Virología. Hawkers. [virologia.bogcindario.com/2011/09/00001-inoculacion-de-virus-huevos-embriados-y-aniales.html](http://virologia.bogcindario.com/2011/09/00001-inoculacion-de-virus-huevos-embriados-y-aniales.html).
2. Aguilar, Alicia y col. (2001). "Aplicación de la técnica de Inmunoperoxidasa para la titulación de cepas de virus Dengue1". Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe. España, Portugal. Vaccimonitor, vol. 10, núm. 1, pp.13-16.
3. Álvarez, Maritza y col. (1991). "Detección de citomegalovirus mediante la técnica de Inmunoperoxidasa y aislamiento viral". Rev. Inst. Med. trop. Sao Paulo. 33(3): 175-17.
4. Asencio, Antonio y col. 2010. "Inmunología". Biología sur. [biologiasur@biologiasur.org](mailto:biologiasur@biologiasur.org)
5. Bellantini, Joshep. (2012). "Clinical Application in Health and Disease". I Care Press. Washington DC. Vol 1. [www.immunologycenter.org](http://www.immunologycenter.org)
6. Blanco, Alfredo. (2012). "Adyuvantes vacúnales". Bases de la respuesta inmunitaria a las vacunas. [vaccunasaep.org/manual/cap3-2.adyuvante\\_vacunales.pdf](http://vaccunasaep.org/manual/cap3-2.adyuvante_vacunales.pdf)
7. Carbajal Guadalupe y col (2014) "Virología médica" editorial Corpus. Buenos Aires. Pág. consul. 219-223,394-400
8. Castellanos, Jaime y col. 2008. "uso de una técnica de Inmunoperoxidasa para la detección de virus de rabia en cortes gruesos de cerebro". Rev. Biomédica. 18(2):141-146.
9. Coll Morales, Julio. (1993). "Técnicas de Diagnóstico en Virología". Ediciones Díaz de Santos, S.A. Madrid, España.vol1 pp:275-279,227-301
10. Cortes, Alejandra y col. 2003. "Validación de la prueba de esterilidad para vacunas virales preparadas en vehículos oleoso y acuoso". Rev. De la Facultad de Farmacia. Vol. 45 (1).
11. Escalante, Williams y col. (2012). "Inmunología de la vacuna". <https://es.slideshare.net/drwilliamsescalante/inmunologia-de-las-vacunas>.
12. Ficha técnica de Eurican Herpes 205. Farmacia Veterinaria. [http://www.farmacioveterinaria.es/index.php?main\\_page=product\\_info&products\\_id=5](http://www.farmacioveterinaria.es/index.php?main_page=product_info&products_id=5)

13. Fontan, Gumersindo. (2005). "Técnicas inmunoenzimáticas para ensayos clínicos y estudios inmunopidemiológicos". Ediciones Finday. La Habana.
14. Fontbonne, Alain (2010). "Herpesvirus Canino. Lo que debe saber sobre el herpes canino". Scribd. <https://es.scribd.com/document/81503088/Herpesvirus-Canino>
15. García, José Ángel, (2000). "Microbiología Medica, Clínica". Volumen 2. Editorial Elsevier. España. Pág. consúl 25-26
16. Gómez, Beatriz. (2015). "HERPES". Laboratorio de Virología, Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina, UNAM. <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/virologia/herpes.html>
17. Guzmán, Sofia. (2015). "Estandarización de Prueba de ELISA de captura para detección de Herpesvirus de Delfín". UNAM.
18. Herrera Uribe, Libia y col. (2004). "Procedimientos en Virología Médica". Editorial de la Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.pp387
19. Inactivación de virus y bacterias. 1987. Traducción de patente europea. Oficina Española de patentes y marcas. No. De publicación ES 2 061 673.
20. Informe Publico Europeo de Evaluación (EPAR). EURICAN HERPES 205. European Medicines Agency. EMEA/V/C/059. [http://www.ema.europa.eu/docs/es\\_ES/document\\_library/EPAR\\_-\\_Summary\\_for\\_the\\_public/veterinary/000059/WC500066408.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/veterinary/000059/WC500066408.pdf)
21. Instituto de Virología C.L.C.V.- INTA. (2018)" Curso de Diagnostico en Virología Animal. Técnicas Inmunohistoquímicas. Pág. consúl 28/01/2018. [http://veterinaria.org/revistas/vetenfinf/vet\\_enf\\_inf\\_tripod/vetenfinftripodcomar/3histo.htm](http://veterinaria.org/revistas/vetenfinf/vet_enf_inf_tripod/vetenfinftripodcomar/3histo.htm)
22. Krogenaes, Anette y col. (2014). "A serological study of canine herpesvirus-1 infection in a population of breeding bitches in Norway."BioMed Central. The Open Access Publisher. Apr 2. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4021736/>
23. León, Lemuel. (2013). "Manual de Prácticas de Laboratorio de Virología". 2da edición. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. México, Toluca.
24. Mandal, Ananya. (2012). "Produccion de vacunas". New, Medical. Life Sciencies. [New-medical.net/health/vaccine-productions.aspx](http://New-medical.net/health/vaccine-productions.aspx).

25. Morris, Joaquín y col. 2000. “Adyuvantes inmunológicos”. Rev. Cubana InvestBiomed. 18(2):130-7.
26. Parham, peter. 2006. “Inmunología 1”. 2da Edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina. Pagconsult. 48-61
27. Reunhardt, G y coll. (2001). “comparación entre dos técnicas de diagnóstico para la diarrea viral bovina (DVB) en 50 predios de la X región, Chile. Seroneutralización y enzimoimmunoensayo indirecto (ELISA)”. Arch.med.vet.v.33;no2. Universidad Auhel de Chile.
28. Rodríguez Padilla, Cristina. (2010). “Manual de Inmunología”. Editorial Trillas S.A de C.V. México.
29. Rojas, Oscar. 2006. “Inmunología (de memoria)”. Tercera Edición. Editorial Medica Panamericana. Impreso en México. Pág. consul. 429-453
30. Santos, José Ignacio. (2012). “Análisis de la Respuesta inmunitaria a las vacunas”. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México.
31. Troncoso, Luzmila, (1998). “Cinética de Auto oxidación del Ascorbato por Iones Cúpricos”. Anales de la Facultad de Medicina. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. ISSN 1025-5583. Vol. 59, No2-1998.
32. Valdivia L.E.G y col. (2016). “Canine Herpesvirus Seroprevalence and Associated Factors in Dogs of México”. Open Journal of Veterinary Medicine. Vol 6, pp 149-162.
33. Valdivia Lara E.G; y col. (2016), “Pathology Isolation and Identification of Canine Herpesvirus (CHV-1) in México” Open Journal of Pathology 111-121 Published Online July 2016 in SciRes.
34. Valdivia, Guillermo y col. (2015). “Isolation and Identification of Herpesvirus in the Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*) of Terminos Lagoon” Campeche. Vol6 (2); 495-504. ISSN 2007-3364.
35. Vargas, Luisa. (2013). “Virus Herpes Canino”. Sistema de Revisiones en investigación Veterinaria de San Marcos. Universidad Nacional Mayor de San marcos. Facultad de Medicina Veterinaria.
36. Vera, Víctor.(2008). “Aislamiento del virus herpes bovino tipo 1 en bovinos del departamento de Córdoba – Colombia”. Rev. MVZ Córdoba Vol. 13 no.3 Córdoba Sep/Dec. ISSN 0122-0268

37. Vilar, G. y col. (2005). "Aislamiento de Herpesvirus Canino asociado a colibacilosis".  
Experiencia en sanidad animal, ROSENBUSH.  
[http://www.rosenbusch.com/argentina/h\\_herpervirus.html](http://www.rosenbusch.com/argentina/h_herpervirus.html).

### 13. ANEXOS

#### Soluciones experimentales

##### MEM al 2%

Medio Mínimo Esencial 10x	10ml
Suero de Ternero Neonato	2ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> dest	90ml
Sol Carbonato/bicarbonato	0.5ml
Estreptomicina 100U	0.5ml
Mantener en refrigeración	

##### Solución reguladora de fosfatos 10x (PBS 10x)

Cloruro de sodio	8 gramos
Cloruro de potasio	0.2 gramos
Fosfato de sodio dibásico	1.44 gramos
Fosfato de potasio monobásico	0.24 gramos

Para preparar Solución Reguladora de Fosfatos 1x (PBS 1x) se diluyen 100 ml de PBS 10 x con 900 ml de agua destilada.

##### Metanol 100%

##### Solución Buffer Tris (TBS)

Tris-HCl	968g
H <sub>2</sub> O dest	80ml

##### Solución de peróxido de hidrogeno 0.6% en metanol al 80%

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%)	4ml
Metanol 80%	16ml

#### Diaminobenzidina (DAB)

DAB	10mg
H <sub>2</sub> O dest	12.5ml

#### Reactivo de Hematoxilina de Harris

#### Solución Carbonato/Bicarbonato 0.05 M pH: 9.6

Carbonato de sodio	1.5 gramos
Bicarbonato de sodio	2.93 gramos
Agua destilada	cbp1000 ml

Neutralizar el pH. a 9.6 con ácido clorhídrico e hidróxido de sodio.

Mantener en refrigeración.

#### Solución de lavado

Solución reguladora de fosfato (PBS 10X)	100ml
--	-------

Twen 20	0.5ml
Agua destilada	900ml

#### Solución reguladora de fosfatos 10x

Cloruro de sodio	8g
Cloruro de potasio	0.2g
Fosfato de sodio dibásico	1.44g
Fosfato de potasio monobásico	0.24g
Agua destilada cbp	100ml

Conjugado anti-anticuerpos de conejo IgG a dilución 1:1650 en solución reguladora de citratos.

#### Solución reguladora de Citratos

Ácido cítrico al 0.1 M	24.3 ml
Fosfatos de sodio dibásico al 0.2 M	25.7 ml
Agua destilada	50 ml
Mantener en refrigeración.	

#### Solución de Color

Solución Reguladora de Citratos	2.5 ml
OPD (O-phenylenediamine)	5mg
Peróxido de hidrógeno concentrado	20 ml

La solución se prepara al momento de su uso. La concentración del Peróxido de Hidrógeno debe ser mayor al 30%

#### Solución de Paro

Ácido orthofosfórico	0.6 ml
Agua destilada	10 ml
Mantener en refrigeración	

#### Solución de bloqueo (10%)

Leche descremada y deslactosada en polvo	10 gramos
Agua destilada	100 ml