

UNIVERSIDAD DE OVIEDO



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Programa de Doctorado en Biología Molecular y Celular

**“Caracterización antigénica y diseño de vacunas
frente a la nueva variante del virus de la
enfermedad hemorrágica del conejo”**

Ana María Podadera González

Oviedo

2019



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: "Caracterización antigénica y diseño de vacunas frente a la nueva variante del virus de la enfermedad hemorrágica del conejo"	Inglés: "Antigenic characterization and design of vaccines against new variant rabbit haemorrhagic disease virus"
2.- Autor	
Nombre: Ana María Podadera González	DNI/Pasaporte/NIE: 20203617
Programa de Doctorado: Biología Molecular y Celular	
Órgano responsable: Universidad de Oviedo	

RESUMEN (en español)

El conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*) es una especie clave en la península Ibérica debido a su importancia ecológica y económica. La enfermedad hemorrágica del conejo (RHD) es una de las principales patologías víricas que afecta a esta especie animal. El agente etiológico es el virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV), especie tipo del género *Lagovirus*, perteneciente a la familia *Caliciviridae*. La nueva variante de RHDV (RHDVb o RHDV2) se describió en España en 2011, causando la muerte de conejos jóvenes, y adultos previamente vacunados, sugiriendo diferencias antigénicas con respecto al virus clásico. La cápsida viral está formada por una proteína mayoritaria (VP1 o VP60) y la proteína minoritaria (VP2 o VP10). Basándose en análisis estructurales la proteína VP1 se divide en dos dominios principales: un dominio interno o "shell" (S), y un dominio externo o protruyente (P). El dominio P también se divide en dos subdominios, P1 y P2. La región más externa del dominio P (P2) contiene lazos expuestos hacia la superficie exterior de la cápsida viral. Esos lazos podrían estar implicados en la unión a los receptores celulares y en la diversidad antigénica del virus. Las vacunas disponibles frente al virus clásico no protegen o lo hacen parcialmente frente a la nueva variante. Por tanto, para detener las elevadas pérdidas económicas y ecológicas causadas por RHDVb se requiere el diseño de nuevas herramientas diagnósticas y vacunas para un mejor control de esta enfermedad. Para abordar este objetivo se llevó a cabo la caracterización antigénica de la proteína VP1 de RHDVb, mediante la producción de anticuerpos monoclonales frente a VLPs pertenecientes a dos tipos de RHDV. En esta tesis se ha demostrado que el epítipo del anticuerpo 2D9 se localiza en el dominio P y que la conformación tridimensional de los lazos expuestos en la superficie de este dominio es determinante para la unión del anticuerpo. La importancia del monoclonal 2D9 radica en su especificidad frente a RHDVb y en su capacidad de neutralizar al virus. Por otro lado, el anticuerpo 3A10 reconoce también a los virus clásicos RHDV-G1 y RHDV-G6 (RHDVa). Basándose en los anticuerpos monoclonales 2D9 y 3A10, se desarrollaron herramientas diagnósticas para la detección específica de RHDVb. El diseño de vacunas frente a la nueva variante se ha abordado de distintas formas, empleando antígenos con distinto grado de complejidad, así como diferentes sistemas de producción y administración de los mismos. 1) un péptido sintético basado en el lazo 1 del subdominio P2 de RHDVb fusionado con la proteína KLH. 2) lactobacilos recombinantes que expresan dominios P de diferentes tipos de RHDV, anclados a la pared o secretados, para su administración como vacuna oral viva. 3) una proteína de fusión GST-dominio P de RHDVb para su uso como una posible vacuna marcada. 4) VLPs de RHDVb producidas en distintos sistemas de cultivos celulares de insecto o crisálidas infectados con baculovirus recombinantes. La eficacia de todos estos antígenos y sistemas se analizó en ensayos de inmunización y desafío con



RHDVb. Los datos obtenidos indican que un péptido sintético basado en el lazo 1 del subdominio P2 de RHDVb no protegió ni indujo la producción de anticuerpos detectables. Resultados similares se obtuvieron con la vacuna oral viva basada en lactobacilos recombinantes que expresan dominios P anclados a la pared. La proteína de fusión GST-dominio P, empleando una dosis de 100 µg/animal, permitió alcanzar una tasa de supervivencia del 50 % y los animales supervivientes mostraban anticuerpos frente a RHDVb. La administración de VLPs de RHDVb (5 y 100 µg/animal con adyuvante) protegió al 100 % de los conejos de la infección por RHDVb. Resultados similares se obtuvieron en la vacunación con 20 µg/animal de extractos de crisálidas que contenían VLPs de RHDVb en presencia de adyuvante. Los resultados presentados en esta tesis aportan un mayor conocimiento sobre las características antigénicas de la proteína VP1 y, junto con las distintas estrategias vacunales probadas, aportan información relevante para la generación de nuevas vacunas efectivas frente a RHDVb.

RESUMEN (en inglés)

The European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) is a key species on the Iberian Peninsula due to its ecological and economic importance. Rabbit haemorrhagic disease (RHD) is the main viral pathogen that affects this species. The etiological agent is rabbit hemorrhagic disease virus, the type species of the *Lagovirus* genus, that belongs to the *Caliciviridae* family. A new variant RHDV (RHDVb or RHDV2) was described in Spain in 2011, causing mortalities in young and previously vaccinated adults, suggesting antigenic differences with respect to the classic virus. The viral capsid is formed by a major protein (VP1 or VP60) and the minor protein (VP2 or VP10). Based on structural analysis, the VP1 protein is divided into two main domains: an internal domain or shell (S) and an external or protruding domain (P). The P domain is also divided into 2 subdomains, P1 and P2. The outermost P region (P2) contains loops exposed on the outer surface of the viral capsid. These loops may be involved in cell attachment and antigenic diversity of the virus. Vaccines available against the classical virus do not protect or protect partially against the new variant. Stopping the intensive economic and ecological losses caused by RHDVb requires the design of new diagnostic tools and vaccines. To tackle this issue, the antigenic characterization of RHDVb VP1 protein was carried out, through the production of monoclonal antibodies against VLPs that belongs to two types of RHDV. In this thesis, it has been demonstrated that the 2D9 epitope is located in the P domain and the three-dimensional conformation of the exposed loops on domain surface is determinant for antibody binding. The importance of mAb 2D9 lies in its specificity against RHDVb, and the capacity to neutralize the virus. mAb 3A10 also recognizes the classic viruses RHDV-G1 and RHDV-G6 (RHDVa). Based on monoclonal antibodies 2D9 and 3A10, diagnostic tools were developed for the specific detection of RHDVb. The design of vaccines against the new variant has been approached in different ways, employing antigens with different degrees of complexity, as well as different production and administration systems. 1) a synthetic peptide based on loop 1 of RHDVb P2 subdomain fused to KLH protein. 2) recombinant lactobacilli expressing P domains from different RHDV types, cell-wall anchored or secreted, for administration as live oral vaccines. 3) a fusion protein GST-P-domain from RHDVb for use as a possible labeled vaccine. 4) RHDVb VLPs produced in different systems of insect cell cultures or chrysalids infected with recombinant baculoviruses. The effectiveness of all these antigens and systems were analyzed in immunization and RHDVb challenge assays. The results obtained indicate that a synthetic peptide based on loop 1 of the RHDVb P2 subdomain was not protective and did not induced detectable antibodies. Similar results were obtained with the oral live vaccine based on recombinant lactobacilli expressing



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

cell wall-anchored P domains. GST-P-domain fusion protein, using a dose of 100 $\mu\text{g}/\text{animal}$, allowed a survival rate of 50 %, and surviving animals showed antibodies against RHDVb. The administration of RHDVb VLPs (5 and 100 $\mu\text{g}/\text{animal}$ with adjuvant) protected 100 % of rabbits from the RHDVb infection. Similar results were obtained in the vaccination with 20 $\mu\text{g}/\text{animal}$ of chrysalid extracts containing RHDVb VLPs in the presence of adjuvant. The results presented in this thesis provide greater knowledge about the antigenic characteristics of the VP1 protein and, together with the different vaccine strategies tested, provide relevant information on the generation of new effective vaccines against RHDVb.

**SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO
EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR**

UNIVERSIDAD DE OVIEDO



Programa de Doctorado en Biología Molecular y Celular

**“Caracterización antigénica y diseño de vacunas frente
a la nueva variante del virus de la enfermedad
hemorrágica del conejo”**

Memoria presentada por **Ana María Podadera González** para optar al
grado de Doctora por la Universidad de Oviedo

Trabajo realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
de la Universidad de Oviedo e Instituto Universitario de Biotecnología de
Asturias

Oviedo, 2019

DIRECTORES:

Dr. Francisco Parra

Dr. Kevin Paul Dalton



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo



INSTITUTO
UNIVERSITARIO DE
BIOTECNOLOGÍA
DE ASTURIAS

Agradecimientos

AGRADECIMIENTOS

Para mí, esta es la parte más complicada de escribir, y no porque no tenga idea de qué escribir sino porque tengo demasiado para hacerlo en un hoja, pero intentaré resumirlo lo mejor que pueda. En primer lugar, agradecer a mis directores de tesis, Dr. Francisco Parra y Dr. Kevin Dalton, por la confianza que depositaron en mí para iniciar este trabajo, y por toda la ayuda, consejos y conocimientos que me han transmitido durante estos cuatro años. A mi tutor académico Pedro Sánchez Lazo, gracias por guiarme en todo el proceso que supone el Doctorado. A los compañeros de laboratorio, Inés, Dani y Chema, darles las gracias por el apoyo incondicional en el trabajo y, más importante, en la vida fuera del departamento. Agradecer a nuestros colaboradores, Juan Ramón de los Toyos, Marcos García y Fernando Vázquez, por el trabajo y los consejos sobre Inmunología. Al resto de la tercera planta, gracias por todo tipo de ayuda, a Pilar de la Peña, Teresa, Pedro Domínguez y Paco Barros.

A los Servicios Científicos Técnicos de la Universidad de Oviedo agradecer al personal de la unidad de Secuenciación, los servicios de Ensayos Biotecnológicos y Biomédicos y al laboratorio de Biotecnología y cultivos celulares, por todo el apoyo técnico, material y humano durante la realización de trabajo. También agradecer a Tania del Servicio de Consultoría Estadística por todo el trabajo y apoyo con la estadística.

Agradecer al Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA), en especial, a Rosa Casais que nos ha ayudado en el arduo trabajo de la experimentación con conejos y me inició en el mundo de los ELISAs. Gracias a nuestros colaboradores del Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA), M^a Cruz y Miguel Ángel, por todo el trabajo realizado y el conocimiento sobre lactobacilos que me han transmitido desde su experiencia. Por otro lado, a la Dra. Mila Leuthold y Dr. Grant S. Hansmann por la aportación de material necesario para el desarrollo de este trabajo.

Cabe agradecer a J. M. Martínez Escribano (ALGENEX) y Oscar Landeta (CERTEST) por compartir vectores de baculovirus, reactivos y protocolos, y colaborar en la puesta a punto del ensayo inmunocromatográfico.

Agradecer al Ministerio de Economía y Competitividad que proporcionó la ayuda económica en forma de proyecto de investigación (AGL-2013-48550-C2-1-R) y beca FPI (BES-2014-069044) para poder desarrollar esta tesis doctoral.

Ya fuera del ámbito de la investigación, a todos los que habéis compartido tiempo conmigo en estos 4 años, gracias por haberme hecho sentir como en casa, y que estar lejos de la familia no fuese tan complicado. Este trabajo ha sido una experiencia para mí de crecimiento a nivel profesional y personal porque me ha aportado mucho y me ha brindado la oportunidad de conocer a personas que seguirán acompañándome en el camino pase lo que pase a partir de esta etapa, de eso estoy segura. Al mismo tiempo, quiero agradecer y recordar a todas las personas que, desde Málaga, y en la distancia, también han estado conmigo y apoyado siempre a seguir adelante, a mis compis de carrera y a Rocío que siempre ha estado ahí cuando más me hacía falta.

Por último, agradecer por todo a mi familia, y muy especialmente a mis padres y hermano que, aunque ha sido dura la distancia, siempre han estado y estarán conmigo. Este trabajo no habría sido posible sin su apoyo y, aunque no lo exprese muy a menudo, les estaré siempre agradecida por el cariño, todo lo que me han dado y enseñado y, sobre todo por los valores que me han inculcado.

Finalmente, esta tesis va dedicada en especial a mis abuelas que, espero, estén orgullosas de “su Anita”.

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de la organización genómica de RHDV 7

Figura 2. Estructura de la cápsida de RHDV y regiones de la proteína VP1 11

Figura 3. Porcentajes de identidad entre los dominios de distintos RHDV 13

Figura 4. Alineamiento de secuencias de la proteína VP1 de distintos RHDV 15

Figura 5. Regiones variables y estructura del dominio P de RHDV 17

Figura 6. Análisis de la producción de anticuerpos en distintos hibridomas mediante ELISA indirecto frente a VLPs de RHDV-Gal09/12 64

Figura 7. Análisis de reactividad en Dot blot de anticuerpos monoclonales frente a distintos tipos de VLPs (RHDV-Nav10/11, RHDV-Ast89 o RHDV-Gal09/12) 65

Figura 8. Análisis Dot blot de la reactividad de sobrenadantes procedentes de hibridomas frente a distintos tipos de VLPs (RHDV-Nav10/11, RHDV-Ast89 o RHDV-Gal09/12) 66

Figura 9. Producción de fragmentos solapantes de la proteína VP1 de RHDV-Nav10/11 68

Figura 10. Análisis de la reactividad en Western blot de anticuerpos monoclonales frente a distintos tipos de VLPs (1-3), proteínas de fusión (4-8) o GST (9) 70

Figura 11. Análisis de la reactividad en Dot blot de los anticuerpos monoclonales frente a distintos tipos de VLPs, proteínas de fusión con GST, GST o BSA 71

Figura 12. Estudio de interacción de los anticuerpos monoclonales que reconocen VLPs de tres tipos de RHDV 72

Figura 13. Análisis de la reactividad en Dotblot del anticuerpo monoclonal 2D9 con distintos antígenos 73

Figura 14. Análisis de supervivencia de conejos infectados experimentalmente con el virus RHDV-Gal08/13 incubado previamente con los anticuerpos monoclonales 2D9 (triángulos), 3A10 (círculos), o sin tratar con anticuerpos (cruces) 74

Figura 15. Modelo tridimensional de las regiones variables de 2D9 77

Figura 16. Modelos de interacción entre el dominio P de RHDV-Nav10/11 y el anticuerpo 2D9 79

Figura 17. Porcentaje de la densidad óptica relativa obtenida en ELISA derivada de la interacción de 2D9 con VLPs de RHDV-Nav10/11 en presencia de péptidos sintéticos correspondientes a los lazos del subdominio P2 83

Figura 18. Análisis de secuencias de la proteína VP1 de aislados silvestres y mutantes de RHDVb.....	84
Figura 19. Análisis de las secuencias y modelos tridimensionales de los mutantes del dominio P	86
Figura 20. Estudio de interacción en Dot blot (A) y dimerización mediante electroforesis (B) nativas (7-11) o desnaturalizantes (1-5) de los mutantes puntuales del dominio P	87
Figura 21. Análisis de interacción mediante ELISA indirecto de los mutantes puntuales del dominio P con 2D9	88
Figura 22. Localización mediante alineamientos y modelos tridimensionales de los residuos sustituidos en los mutantes de lazo del dominio P de RHDV-Nav10/11	91
Figura 23. Estudio de dimerización de los mutantes de lazo del dominio P de RHDV-Nav10/11	92
Figura 24. Análisis mediante ELISA de la interacción entre 2D9 y los mutantes de lazo del dominio P de RHDV-Nav10/11.	93
Figura 25. Análisis de la presencia de viriones de RHDV-Ast89 (RHDV-G1) y RHDV-Nav10/11 (RHDVb) usando un dispositivo de inmunocromatografía lateral..	96
Figura 26. Esquema de plásmidos integrativos para la generación de lactobacilos recombinantes.....	101
Figura 27. Esquema de los casetes de expresión de los distintos lactobacilos recombinantes.....	102
Figura 28. Análisis de la expresión de dominios P por citometría de flujo.....	103
Figura 29. Vector de expresión, análisis de la producción y purificación de la proteína de fusión GST-dominio P de RHDV-Nav10/11	105
Figura 30. Análisis Dot blot de la reactividad con anticuerpos de la fusión GST-dominio P.....	106
Figura 31. Análisis SDS-PAGE de muestras de VLPs purificadas y extractos de crisálidas que producen VLPs	109
Figura 32. Esquema del diseño experimental del ensayo de inmunización con el péptido sintético conjugado KLH-NL15	110
Figura 33. Análisis Western blot de la presencia de anticuerpos en sueros de conejos a los 61 días del primer tratamiento con KLH-NL15 (C113-C118) o KLH (C111 y C112).....	112

Figura 34. Análisis mediante ELISA de la presencia de anticuerpos en sueros de conejos a los 72 días después del primer tratamiento con KLH-NL15 o KLH.....	113
Figura 35. Supervivencia de conejos tratados con el péptido conjugado KLH-NL15 frente a la infección con RHDVb	114
Figura 36. Esquema del diseño experimental para el ensayo de vacunación oral con lactobacilos recombinantes.....	115
Figura 37. Análisis ELISA de la presencia de anticuerpos frente a distintos tipos de RHDV en sueros de conejos tratados oralmente con lactobacilos recombinantes	116
Figura 38. Supervivencia frente a RHDVb (Gal08/13) después de la administración oral de distintos tipos de lactobacilos recombinantes que expresan, anclados a la pared, distintos dominios P: DomPAst89-Histag (rombos), DomPAst89 (cuadrados), DomPNav10/11 (triángulos)	119
Figura 39. Esquema del diseño experimental para el estudio de la eficacia vacunal, frente a RHDVb, de tratamientos con VLPs o la proteína de fusión GST-dominio P	120
Figura 40. Supervivencia de conejos frente a RHDVb tras la vacunación con VLPs o GST-dominio P.....	122
Figura 41. Cuantificación del número de copias de ARN viral en muestras de hígado mediante RT-PCR	125
Figura 42. Modelos tridimensionales en vista de superficie (imágenes a la izquierda) y distribución del potencial electrostático (imágenes a la derecha) del dominio P de RHDV-Nav10/11 y los mutantes puntuales (A) N387A; (B) N387D; (C) AT414-15	137
Figura 43. Modelos tridimensionales en vista de superficie (A) y de distribución del potencial electrostático (B) del dominio P de RHDV-Nav10/11 (DomPNav11) y del mutante de lazo 1 (L1Ast89-DomPNav11).....	138
Figura 44. Modelos tridimensionales vistos en superficie (A) y en distribución del potencial electrostático (B) del dominio P de Nav10/11 (DomPNav11) y del mutante de lazo 2 (L2Ast89-DomPNav11).....	139
Figura 45. Modelos tridimensionales del dominio P de Nav10/11 (DomPNav11) y del mutante de lazo 3 (L3Ast89-DomPNav11) en vistas de superficie (A) y de distribución del potencial electrostático superficial (B).....	139
Figura 46. Modelos tridimensionales del dominio P de Nav10/11 (DomPNav11) y del mutante en el lazo 4 (L4Ast89-DomPNav11) mostrando la superficie (A) y la distribución del potencial electrostático (B).....	140

Figura 47. Modelos tridimensionales en vista de superficie (**A**) y distribución del potencial electrostático (**B**) del dominio P de RHDV-Nav10/11 (DomPNav11) y el mutante del lazo 5 (L5Ast89-DomPNav11)..... 140

Figura S1. Alineamiento de secuencias de ADN de dominios P de RHDV-Nav10/11, RHDVG1-Ast89 y mutantes de lazos 185

Figura S2. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de dominios P de RHDV-Nav10/11, RHDVG1-Ast89 y mutantes de lazos..... 185

Lista de Tablas

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Concordancia de las nomenclaturas previas y la propuesta según Le Pendu <i>et al.</i> , 2017.....	10
Tabla 2. Nomenclatura de los aislados víricos utilizados en el presente trabajo.....	29
Tabla 3. Características de los péptidos sintéticos utilizados en este trabajo.....	33
Tabla 4. Oligonucleótidos empleados en la clonación de dominios P de RHDV para la generación de los plásmidos integrativos.....	42
Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados en la clonación de fragmentos solapantes de la proteína VP1 de RHDV-Nav10/11.....	44
Tabla 6. Características de los mutantes puntuales de dominios P de RHDVb	47
Tabla 7. Oligonucleótidos empleados en la mutagénesis de los lazos del dominio P-Nav10/11	48
Tabla 8. Reactividad en Dot blot de anticuerpos monoclonales frente a distintos tipos de VP1.....	64
Tabla 9. Cuantificación de ARN viral en animales infectados con RHDV tratados con anticuerpos monoclonales.	75
Tabla 10. Secuencias de ADN y aminoácidos del dominio variable del anticuerpo 2D9	76
Tabla 11. Aminoácidos implicados en las interacciones polares entre el monómero del dominio P de RHDV-Nav10/11 y 2D9, deducidos de la simulación por <i>docking</i>	80
Tabla 12. Aminoácidos implicados en las interacciones polares entre el dímero del dominio P de RHDV-Nav10/11 y 2D9, deducidos de la simulación por <i>docking</i>	80
Tabla 13. Secuencia y localización de los péptidos sintéticos correspondientes a los 5 lazos del subdominio P2 de la VP1 de RHDV-Nav10/11.....	81
Tabla 14. Porcentajes de inhibición de la interacción de 2D9 con VLPs de RHDV-Nav10/11 medidos por ELISA en presencia de péptidos sintéticos.....	82
Tabla 15. Interacción del anticuerpo 2D9 con los mutantes puntuales de dominio P expresada en porcentajes de densidad óptica relativa con respecto al control positivo en ensayos de ELISA.....	89
Tabla 16. Análisis ELISA de la interacción del anticuerpo 2D9 con los mutantes de lazo del dominio P expresada en porcentajes de densidad óptica relativa con respecto al control positivo.....	94

Tabla 17. Muestras positivas y negativas analizadas mediante (RT-PCR y ELISA) o inmunocromatografía lateral	97
Tabla 18. Resumen del diseño de los ELISAs tipo sandwich	98
Tabla 19. Análisis ELISA de extractos de hígado de conejo infectados y no infectados con distintos tipos de RHDV, utilizando placas tapizadas con los anticuerpos 3A10 o 2D9	99
Tabla 20. Influencia del uso de distintos sistemas celulares y de la optimización de secuencias del gen VP1 en la producción de VLPs.....	107
Tabla 21. Análisis de la presencia de anticuerpos frente a RHDV en sueros de conejos tratados con KLH o KLH -NL15 empleando un sistema ELISA comercial (INGENASA).....	111
Tabla 22. Análisis de la producción de anticuerpos frente a distintos RHDV en suero tras la administración oral de lactobacilos recombinantes.....	117
Tabla 23. Cuantificación de lactobacilos recombinantes en heces de conejos tratados oralmente.....	118
Tabla 24. Análisis de la presencia de anticuerpos frente a RHDV en animales supervivientes mediante ELISA comercial (INGENASA).....	123
Tabla 25. Presencia de anticuerpos frente a VLPs de distintos RHDV en animales supervivientes a un desafío con RHDVb y previamente tratados con VLPs o GST-P.....	124
Tabla S1. Hibridomas obtenidos tras la inmunización de ratones con VLPs de distintos RHDV.....	183

Abreviaturas

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BSA	Sero-albúmina bovina
CDR	Región determinante de complementariedad
DL₅₀	Dosis letal 50 %
dpi	Días post-infección/días post-inmunización
EDTA	Ácido etilen-diaminotetraacético
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (de las siglas en inglés, <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>)
GST	Proteína glutatión S-transferasa
HF	High-five (línea celular de <i>Trichoplusia ni</i>)
HBGAs	Antígenos de los grupos sanguíneos (de las siglas en inglés <i>Histo-Blood Group Antigens</i>)
hpi	Horas post-infección/horas post-inmunización
ICTV	Comité Internacional para la Taxonomía de los Virus (del inglés, <i>International Committee for the Taxonomy of Viruses</i>)
IgG	Inmunoglobulina G
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
KLH	Hemocianina de lapa (de las siglas en inglés, <i>Keyhole Lympet Hemocyanin</i>)
LB	Luria-Bertani (Medio para crecimiento de bacterias)
MAb	Anticuerpo monoclonal (del inglés <i>monoclonal antibody</i>)
MCS	Sitio de clonación múltiple (del inglés, <i>multiple cloning site</i>)
Moi	Multiplicidad de infección (del inglés, <i>multiplicity of infection</i>)
NS	Proteína no estructural
ORF	Marco abierto de lectura (de las siglas en inglés, <i>Open Reading Frame</i>)
PBS	Tampón fosfato salino (del inglés, <i>phosphate-buffered saline solution</i>)
PBS-Tw	Tampón fosfato salino con 0,05 % Tween 20

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, <i>polymerase chain reaction</i>)
rBV	Baculovirus recombinante
RCV	Calicivirus no patogénico
RHDV	Virus de la enfermedad hemorrágica del conejo
RT-qPCR	PCR cuantitativa con transcripción reversa (de las siglas en inglés de <i>Reverse Transcription Quantitative PCR</i>)
SDS	Dodecil sulfato sódico
Sf9	Línea celular de <i>Spodoptera frugiperda</i>
SFB	Suero fetal bovino
TAE	Tampón Tris-acetato-EDTA
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
Ufp	Unidades formadoras de placa
VLP	Partícula similar al virus (del inglés, <i>virus-like particles</i>)
VP60	Proteína principal de la cápsida de calicivirus
VP1	Proteína principal de la cápsida del virus de la enfermedad hemorrágica del conejo
VPg	Proteína viral unida al genoma (del inglés, <i>viral protein genome-linked</i>)

Índice

ÍNDICE	
AGRADECIMIENTOS	I
LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE TABLAS	IX
ABREVIATURAS	XII
ÍNDICE	XV
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. IMPORTANCIA DEL CONEJO EN ESPAÑA	1
1.2. LA ENFERMEDAD HEMORRÁGICA DEL CONEJO	2
1.3. VIRUS DE LA ENFERMEDAD HEMORRÁGICA DEL CONEJO (RHDV)	5
1.3.1. Familia Caliciviridae	5
1.3.2. Organización y expresión genómica de RHDV	6
1.3.3. Filogenia y evolución del género <i>Lagovirus</i> : La nueva variante del virus RHDV	8
1.3.4. La cápsida viral	10
1.3.5. Regiones antigénicas de la proteína principal de la cápsida (VP1)	13
1.4. ESTRATEGIAS VACUNALES	18
1.4.1. Vacunas clásicas	18
1.4.2. Vacunas basadas en VLPs	19
1.4.3. Vacunas basadas en VLPs quiméricas de RHDV	20
1.4.4. Péptidos sintéticos como antígenos vacunales	21
1.4.5. Bacterias lácticas como vacunas vivas	22
1.4.6. Vacunas marcadas	24
2. OBJETIVOS	26
3. MATERIAL Y MÉTODOS	29
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO	29
3.1.1. Virus	29
3.1.2. Animales	29

3.1.3. Muestras de hígados	30
3.1.4. Células procariotas	30
3.1.5. Células eucariotas	31
3.1.6. Vectores plasmídicos	31
3.1.7. Péptidos sintéticos	32
3.1.8. Fragmentos de ADN sintético	33
3.1.9. Anticuerpos	33
3.2. MÉTODOS DE CULTIVOS CELULARES	34
3.2.1. Cultivo de células eucariotas	34
3.2.2. Cultivo de células bacterianas	34
3.2.3. Transfección de células de insecto y producción de baculovirus recombinantes (rBVs)	35
3.2.4. Transformación de células <i>E. coli</i>	36
3.3. MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	37
3.3.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	37
3.3.2. Extracción de ARN a partir de hígado de conejo	38
3.3.3. RT-qPCR para cuantificación de copias de ARN viral de RHDV	38
3.3.4. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa o productos de PCR	38
3.3.5. Purificación de ADN plasmídico a partir de cultivos bacterianos	39
3.3.6. Cuantificación de ADN	39
3.3.7. Secuenciación de ADN	39
3.4. ELECTROFORESIS EN GELES	39
3.4.1. Electroforesis de ADN	39
3.4.2. Electroforesis de proteínas	40
3.5. GENERACIÓN DE LACTOBACILOS RECOMBINANTES	41
3.6. GENERACIÓN Y/O PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN Y DOMINIOS P DE RHDV	43
3.6.1. Clonación de fragmentos solapantes de VP1 de RHDV-Nav10/11 fusionados a la proteína GST	43

3.6.2. Dominios P de RHDV-Nav10/11 fusionados a GST	44
3.6.3. Dominios P fusionados con MBP y cola His-tag	46
3.6.4. Clonación y producción de dominios P mutantes puntuales basados en aislados naturales de RHDVb	46
3.6.5. Mutagénesis, clonación y producción de dominios P mutantes de lazo de VP1 de RHDV-Nav10/11	47
3.7. PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE PARTÍCULAS SIMILARES AL VIRUS (VLPs)	49
3.8. SECUENCIACIÓN DE LA FRACCIÓN VARIABLE DEL ANTICUERPO MONOCLONAL 2D9	50
3.9. MÉTODOS INMUNOLÓGICOS DE CARACTERIZACIÓN Y/O DETECCIÓN DE PROTEÍNAS Y ANTICUERPOS	51
3.9.1. Western blot	51
3.9.2. Dot blot.....	51
3.9.3. ELISAs para selección de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales frente a VLPs	52
3.9.4. ELISAs tipo sandwich.....	52
3.9.5. ELISAs para la determinación de la presencia de anticuerpos frente a RHDV u otros antígenos en sueros de conejos	53
3.9.6. ELISAs con anticuerpo monoclonal 2D9 purificado	54
3.9.7. Citometría de flujo con lactobacilos.....	54
3.9.8. Hemaglutinación de glóbulos rojos humanos	55
3.10. EXPERIMENTACIÓN ANIMAL	56
3.10.1. Inmunización de conejos.....	56
3.10.2. Retos con virus RHDV	56
3.10.3. Neutralización del virus RHDV-Gal08/13 con anticuerpos monoclonales	57
3.10.4. Generación de anticuerpos monoclonales.....	57
3.11. PROGRAMAS INFORMÁTICOS	58
3.11.1. Análisis de secuencias de ADN y proteínas.....	58
3.11.2. Visualización y análisis de imagen	58
3.11.3. Tratamiento de datos y análisis estadísticos	59

4. RESULTADOS	62
4.1. CARACTERIZACIÓN ANTIGÉNICA DE LA PROTEÍNA PRINCIPAL DE LA CÁPSIDA (VP1) DE LA NUEVA VARIANTE DEL RHDV (RHDVb).....	62
4.1.1. Producción de anticuerpos monoclonales frente a VP1 de distintos aislados de RHDV (RHDVb y RHDVa)	62
4.1.2. Estudio de la especificidad de los anticuerpos monoclonales	63
4.1.3. Clonación y producción de fragmentos solapantes de VP1 de RHDV-Nav10/11.....	67
4.1.4. Caracterización de anticuerpos monoclonales generados frente a VLPs de RHDV.....	68
4.2. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN DEL ANTICUERPO MONOCLONAL 2D9 CON SU EPÍTOPO.....	73
4.2.1. Estudio de la capacidad neutralizante del anticuerpo 2D9.....	73
4.2.2. Localización de epítomos del anticuerpo monoclonal 2D9.	76
4.2.3. Diseño de dominios P mutantes basados en secuencias de aislados naturales mutantes de RHDVb.....	83
4.2.4. Estudio de la reactividad con 2D9 de mutantes de lazos del dominio P de RHDV-Nav10/11.....	89
4.2.5. Desarrollo de nuevas herramientas diagnósticas para la detección de RHDVb	95
4.3. DISEÑO Y PRODUCCIÓN DE CANDIDATOS VACUNALES FRENTE A LA NUEVA VARIANTE DE RHDV.....	99
4.3.1. Péptido sintético basado en el lazo 1 del dominio P de RHDV-Nav10/11	99
4.3.2. Lactobacilos recombinantes que expresan dominios P de RHDV	100
4.3.3. Fusión GST-dominio P de RHDV-Nav10/11	104
4.3.4. Partículas virales similares al virus (VLPs)	106
4.4. ESTUDIOS DE PROTECCIÓN DE DISTINTOS CANDIDATOS VACUNALES FRENTE A RHDVb	109
4.4.1. Péptido sintético basado en el lazo 1 del dominio P de RHDV-Nav10/11	109
4.4.2. Evaluación de la eficacia de la vacunación oral con lactobacilos recombinantes.....	114
4.4.3. Evaluación de la eficacia de vacunación con VLPs y dominios P de RHDV-Nav10/11.....	119

5. DISCUSIÓN	128
5.1. CARACTERIZACIÓN ANTIGÉNICA DE LA PROTEÍNA PRINCIPAL DE LA CÁPSIDA DE RHDV	128
5.2. ANÁLISIS DE LA REACTIVIDAD DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL ESPECÍFICO Y NEUTRALIZANTE DE LA NUEVA VARIANTE DEL RHDV, Y DESARROLLO DE HERRAMIENTAS DIAGNÓSTICAS	130
5.3. EVALUACIÓN DE DISTINTAS ESTRATEGIAS VACUNALES E IMPORTANCIA DEL ANTÍGENO VACUNAL EMPLEADO	144
6. CONCLUSIONES	158
7. BIBLIOGRAFÍA	162
8. ANEXO	183
8.1. TABLA SUPLEMENTARIA	183
8.2. FIGURAS SUPLEMENTARIAS	184

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1. IMPORTANCIA DEL CONEJO EN ESPAÑA

El conejo común o europeo, *Oryctolagus cuniculus*, perteneciente al orden *Lagomorpha*, es una especie clave para el ecosistema mediterráneo (Delibes-Mateos *et al.*, 2008a) y es en buena medida responsable de una gran tradición cinegética en la península Ibérica. La ganadería del conejo es también una actividad relevante en muchas regiones de España, por lo que esta especie animal es importante tanto ecológica como económicamente. La península Ibérica es la única región del mundo donde coexisten dos subespecies de conejo europeo, *O. cuniculus cuniculus* y *O. cuniculus algirus*, con un patrón de distribución geográfica y muy bien marcado, con capacidad de hibridar entre sí (Ferrand, 1995; Branco *et al.*, 2000; Branco *et al.*, 2002; Geraldès *et al.*, 2006).

Los conejos silvestres modifican la composición de especies de plantas y la estructura de la vegetación de su hábitat mediante el pastoreo y la dispersión de semillas, lo cual permite la conservación de la diversidad de especies de plantas y animales, como por ejemplo las lagartijas (Delibes-Mateos *et al.*, 2008b; Ferreira, 2012; Gálvez Bravo *et al.*, 2009; Gálvez *et al.*, 2008). Por otro lado, suponen la presa principal para importantes depredadores como el lince ibérico (*Lynx pardinus*) que se encuentra en peligro crítico de extinción y el águila imperial (*Aquila adalberti*). Una de las características más importante del conejo es su elevada capacidad colonizadora por su adaptabilidad a una gran variedad de hábitats. La cecotrofia le permite obtener nutrientes a partir de alimentos de muy baja calidad (Hirakawa, 2001). Además, es una especie muy prolífica debido a que alcanzan la madurez sexual a los 4 meses, las hembras son receptivas durante todo el año y las camadas son de gran tamaño. Como consecuencia de la gran prolificidad, y la falta de competidores y depredadores, el conejo puede alcanzar elevadas densidades y provocar daños tanto económicos como ecológicos. Esto ha ocurrido en algunas regiones de España donde ha sido reconocido como una especie plaga por los daños agrícolas y forestales que ha ocasionado. A pesar de lo anterior, las poblaciones salvajes de conejo se han visto reducidas drásticamente en la península Ibérica, con las consecuencias ecológicas y económicas que ello conlleva (Delibes-Mateos *et al.*, 2014; Delibes-Mateos *et al.*, 2007), por tanto, la recuperación de la población natural de conejos es uno de los mayores retos para la conservación del ecosistema en nuestra península.

La principal aptitud productiva del conejo es la cárnica, debido a su elevada prolificidad y la brevedad de sus ciclos reproductivos y de engorde que le confiere un gran potencial de producción. La cría de este animal también puede dirigirse a la obtención de piel o pelo, para su uso como animal de experimentación, como animal de compañía y para la realización de repoblaciones cinegéticas (MAPAMA, 2018). La amplia distribución geográfica del conejo y las elevadas densidades que alcanza, hacen de este animal una de las especies cinegéticas de caza menor más codiciadas (Angulo y Villafuerte, 2003).

La cunicultura es la ciencia aplicada, del área de conocimiento de producción animal, que se ocupa de la cría de conejos para aprovechar su carne y sus demás productos (Lebas *et al.*, 1996), es una disciplina de gran relevancia en España, ya que es el tercer país del mundo productor de carne de conejo, tras China y la República Popular de Corea (FAO, 2017). La cunicultura, como actividad pecuaria, ha experimentado en los últimos años una importante evolución y ha alcanzado una considerable relevancia y un creciente interés. La carne de conejo representa el quinto tipo de carne más consumido tras el porcino, aves, vacuno y ovinocaprino. España es uno de los principales productores mundiales de carne de conejo y, junto con Italia y Francia, forma parte del grupo líder de países a nivel continental.

1.2. LA ENFERMEDAD HEMORRÁGICA DEL CONEJO

La enfermedad hemorrágica del conejo se describió por primera vez en China en 1984 (Liu *et al.*, 1984) en conejos que habían sido importados desde Alemania. Posteriormente, se describió la aparición de esta enfermedad en Europa, en Italia en 1986 (Cancellotti y Renzi, 1991). En la península Ibérica, dónde el conejo europeo supone un importante papel en el ecosistema, el primer brote de la enfermedad se detectó en España en 1988 (Argüello Villares *et al.*, 1988) y en Portugal en 1989 (Anonymous *et al.*, 1989). En la actualidad, los brotes de esta enfermedad ocurren en todos los continentes y causa elevadas tasas de mortalidad, habiendo sido descrita en más de 40 países de Asia, África, América, Europa y Oceanía. Siendo ya una enfermedad endémica en muchas zonas del mundo (McIntosh *et al.*, 2007), afecta tanto a conejos domésticos como a poblaciones salvajes (revisado por Abrantes *et al.*, 2012b). Esta enfermedad causa importantes pérdidas económicas en la industria de la carne y la piel de conejo, así como un impacto

ecológico negativo sobre las poblaciones salvajes de conejos y sus principales depredadores (Delibes-Mateos *et al.*, 2008a; Villafuerte *et al.*, 1995).

La enfermedad hemorrágica del conejo se caracteriza por su elevada morbilidad y mortalidad alcanzando tasas de mortalidad entre el 70 % y 100 % (OIE, 2016). El periodo de incubación puede variar desde 1 a 3 días, y la muerte se produce generalmente entre las 12 y 36 horas tras la aparición de fiebre. La evolución clínica de la enfermedad hemorrágica del conejo puede ser hiperaguda, aguda, subaguda o crónica (Marcato *et al.*, 1991; Xu y Chen, 1989). La forma hiperaguda generalmente no presenta sintomatología y el animal muere repentinamente. Las manifestaciones clínicas se han descrito sobre todo en la infección aguda, donde los conejos mueren entre 1 y 3 días tras la infección, en alguna ocasión aparece hemorragia externa en el hocico (Cooke, 2002). En la necropsia los conejos muestran hepatitis aguda y signos de alteraciones de la coagulación sanguínea que afecta a órganos como el bazo o los pulmones (Park *et al.*, 1995; Gortázar *et al.*, 2000). Los anticuerpos desarrollados en una infección subaguda confieren la protección al animal frente a una nueva re-infección (Patton, 1989). En el reducido número de conejos que sobreviven (5-10 %), la respuesta específica y relevante que aparece en primer lugar a los tres días de la infección son IgMs, seguida por IgAs e IgGs que se detectan 2 o 3 días después (Barbieri *et al.*, 1997). Esta respuesta de anticuerpos dispara el mecanismo para la eliminación de los virus. En lugar de esta rápida respuesta humoral, entre el 5-10 % de los conejos muere entre 4 y 8 días post-infección debido a una forma crónica de la enfermedad hemorrágica. En el hígado y riñón de estos conejos, han sido detectadas partículas similares al RHDV, también llamadas VLPs (*virus-like particles*), en lugar del virus (Capucci *et al.*, 1991; Granzow *et al.*, 1996; Barbieri *et al.*, 1997). En algunos casos, se encontraron partículas denominadas CLPs (*core-like particles*) caracterizadas por la ausencia de la cubierta o concha externa de la cápsida viral, formadas por parte del extremo carboxilo terminal de la proteína mayoritaria de la cápsida llamada VP60 (Granzow *et al.*, 1996). Como consecuencia de esto las CLPs son negativas en ensayos de hemaglutinación (HA), así como frente a anticuerpos monoclonales anti-RHDV (mAbs) que reconocen epítomos conformacionales (Capucci *et al.*, 1995). En sangre y heces de conejos convalecientes, así como en conejos infectados por RHDV, pero protegidos mediante anticuerpos previamente adquiridos (por ejemplo, tras una vacunación o recuperación tras la infección por RHDV), el ARN viral se detecta usando RT-PCR hasta 15 semanas después de la infección (Gall *et al.*, 2007; Gall y Schirmer, 2007).

2006). Si este hecho se debe a una lenta desaparición del virus o a una prolongada persistencia del virus está aún por determinar.

Como resultados de las pruebas serológicas (Capucci *et al.*, 1997; Capucci *et al.*, 1991; Collins *et al.*, 1995; Cooke *et al.*, 2000) se han aislado, y caracterizado parcialmente en Europa y Oceanía varios calicivirus de conejo no patogénicos relacionados con RHDV (Capucci *et al.*, 1996; Capucci *et al.*, 1998; Le Gall-Reculé *et al.*, 2011b; Moss *et al.*, 2002; Strive *et al.*, 2009; White *et al.*, 2004). Estos calicivirus inducen una respuesta serológica que puede interferir y complicar el diagnóstico serológico (Capucci *et al.*, 1991; Cooke *et al.*, 2000; Marchandeu *et al.*, 2005; Nagesha *et al.*, 2000; Robinson *et al.*, 2002).

Puesto que el hígado contiene las cantidades más elevadas de viriones es el órgano elegido para la identificación tanto de RHDV como EBHSV (virus del síndrome de la fiebre parda europea o *European brown hare syndrome virus*). La cantidad de virus presente en otras partes del cuerpo es proporcional a la vascularización, así el bazo y el suero pueden servir como materiales para el diagnóstico alternativo, aunque los resultados no son óptimos. En bazo se han encontrado mayores niveles de VLPs que en hígado de animales que murieron por la forma subaguda o crónica de la enfermedad (Capucci *et al.*, 1991; Granzow *et al.*, 1996; Barbieri *et al.*, 1997). El tratamiento de las muestras para el diagnóstico es casi idéntico independientemente del método de diagnóstico que se aplique, con la excepción de las tiras inmunocromatográficas en las que se puede utilizar tanto homogeneizados de órganos como exudados del animal (Dalton *et al.*, 2017). Un fragmento de órgano se homogeneiza mecánicamente en 5-20 % p/v en tampón fosfato salino (PBS), pH 7,2-7,4, después se filtra y se clarifica mediante centrifugación a 5000 g durante 15 minutos. El sobrenadante puede ser directamente examinado mediante el test de hemaglutinación o ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas). Si la muestra va a ser observada al microscopio electrónico, es aconsejable realizar una segunda centrifugación a 12000 g durante 15 min, antes de la ultracentrifugación final. Para la detección mediante PCR, el ARN viral de las muestras puede ser extraído directamente de los tejidos.

Los primeros aislados de RHDV se caracterizaron por afectar a conejos mayores de 2 meses, causando tasas de mortalidad entre el 70 y 100 %, mientras que los conejos jóvenes (o gazapos) sufren una infección subclínica o no se ven afectados (Mikami *et al.*, 1999;

OIE, 2016; Prieto *et al.*, 2000). Sin embargo, la nueva variante del virus surgida en el año 2011 provocó brotes atípicos de la enfermedad afectando a animales adultos y gazapos. En estudios sobre un aislado del virus de la nueva variante (RHDV-Nav10/11) se ha descrito que causa la enfermedad y muerte en gazapos de menos de 40 días (Dalton *et al.*, 2015), además provoca tasas de mortalidad en adultos y gazapos de hasta el 20 % y 50 %, respectivamente (Dalton *et al.*, 2012). Recientemente, se han descrito cepas de la nueva variante del virus con mayor virulencia y tasas de mortalidad superiores (Capucci *et al.*, 2017). Además, se han demostrado diferencias en la patogenicidad de la nueva variante (Calvete *et al.*, 2018) y el curso clínico de la enfermedad cuando el aislado RHDV-Nav10/11 infecta animales adultos o gazapos, existiendo importantes variaciones del tropismo del virus por determinados tejidos, como pulmón, riñón o intestino, que no muestran presencia del virus en individuos adultos, pero sí en gazapos (Dalton *et al.*, 2018b).

1.3. VIRUS DE LA ENFERMEDAD HEMORRÁGICA DEL CONEJO (RHDV)

El agente etiológico de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHD) se denomina virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV), es un virus no envuelto de pequeño tamaño cuyo genoma está compuesto por una molécula de ARN de cadena simple de sentido positivo perteneciente a la familia *Caliciviridae*, género *Lagovirus* (Green *et al.*, 2000; Meyers *et al.*, 1991b; Moussa *et al.*, 1992; Ohlinger *et al.*, 1990; Ohlinger y Thiel, 1991; Parra y Prieto, 1990).

1.3.1. Familia Caliciviridae

Los miembros de la familia *Caliciviridae* son virus no envueltos de pequeño tamaño y morfología casi esférica, que infectan a vertebrados. Su genoma es una molécula de ARN lineal de una sola cadena y de polaridad positiva (Clarke y Lambden, 1997; Thiel y König, 1999). Los calicivirus humanos son ahora la principal causa de brotes de gastroenteritis debido a la contaminación de la comida. Además, los calicivirus han sido estudiados durante años por virólogos y veterinarios interesados en importantes patógenos animales como el virus del exantema vesicular porcino y el calicivirus felino.

El Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) reconoce 4 géneros dentro de la familia *Caliciviridae*: *Lagovirus*, *Vesivirus*, *Norovirus* y *Sapovirus*. Además, tres géneros más se han propuesto dentro de esta familia: *Nabovirus* o *Becovirus* (Oliver *et*

al., 2006), *Recovirus* (Farkas *et al.*, 2008) y *Valovirus* (L'Homme *et al.*, 2009); sin embargo, todavía no están reconocidos por el ICTV. Los calicivirus infectan a un amplio rango de especies y causan una variedad de enfermedades, tales como gastroenteritis (*Norovirus* y *Sapovirus*), enfermedad hemorrágica (*Lagovirus*), y lesiones vesiculares e infecciones respiratorias (*Vesivirus*).

El género *Lagovirus* incluye tanto al RHDV como al virus del síndrome de la liebre parda europea, EBHSV, un virus que se detectó por primera vez en Suecia en los años 80, antes del primer brote de RHDV que afecta a las especies de liebre *Lepus europaeus* y *Lepus timidus*. El síndrome de la liebre europea está relacionado con la RHD en cuanto a signos clínicos, alteraciones patológicas e histopatológicas, tasas de mortalidad, morfología y antigenicidad del virion, sin embargo, no se han obtenido de forma reproducible ni infección ni protección interespecífica en el conejo. Aunque causen enfermedades similares, EBHSV y RHDV representan distintos agentes infecciosos que infectan a especies distintas (Capucci *et al.*, 1991; Chasey *et al.*, 1992; Fuchs y Weissenböck, 1992; Lavazza *et al.*, 1996; Marcato *et al.*, 1991; Wirblich *et al.*, 1994).

1.3.2. Organización y expresión genómica de RHDV

El genoma de RHDV está compuesto por ARN de polaridad positiva, de modo que los viriones contienen ARN genómico y ARN subgenómico que es colineal con el extremo 3' del ARN genómico (Meyers *et al.*, 1991a; 1991b; Meyers *et al.*, 2000). Ambas moléculas de ARN contienen una cola de poliadenilación en el extremo 3' y el extremo 5' se encuentra covalentemente unido a una proteína VPg (*virus genome-linked*) (Abrantes *et al.*, 2012a; Machín *et al.*, 2001; Meyers *et al.*, 1991a) (**Figura 1**). El ARN genómico consiste en una molécula de ARN de cadena simple y polaridad positiva de 7,4 kb que contiene dos marcos abiertos de lectura. El ORF1 codifica una poliproteína de 257 kDa, que tras el procesado mediante una proteasa viral da lugar a proteínas no estructurales y a la proteína mayoritaria de la cápsida (VP1 o VP60) (Martín Alonso *et al.*, 1996; Meyers *et al.*, 2000; Wirblich *et al.*, 1996). El ORF2, solapado con el primero unos pocos nucleótidos, codifica la proteína estructural minoritaria (VP2 o VP10) de unos 10-12 kDa de tamaño y cuya función estaría relacionada con la regulación de la replicación viral y liberación de los viriones desde las células infectadas (Chen *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2008; Wirblich *et al.*, 1996). El ARN subgenómico codifica ambas proteínas estructurales, VP1 y VP2 (Abrantes *et al.*, 2012b; Boga *et al.*, 1992) (**Figura**

1). Las proteínas no estructurales han sido estudiadas mediante análisis de secuencias y estudios funcionales. La localización intracelular de las proteínas p16 (NS1), p23 (NS2) y p29 (NS4) se han determinado recientemente (Urakova *et al.*, 2015), aunque sus funciones no están esclarecidas aún. Las proteínas NS3 y NS7, corresponden a una helicasa (Kadaré y Haenni, 1997; Marín *et al.*, 2000) y una polimerasa de ARN dependiente de ARN (López Vázquez *et al.*, 1998; 2001; Machín *et al.*, 2001), respectivamente. La proteasa de RHDV (NS6), aunque considerablemente de menor tamaño, tiene homología en las secuencias de aminoácidos del centro catalítico con las proteasas 3C de los picornavirus (Boniotto *et al.*, 1994; Oka *et al.*, 2011; Wirblich *et al.*, 1995). La proteína VPg (NS5) en RHDV, al igual que en otros calivirus, como norovirus humanos y calicivirus felinos (FCV), es imprescindible para el inicio del proceso de traducción del ARN viral mediante la maquinaria celular (Daughenbaugh *et al.*, 2003; Goodfellow *et al.*, 2005).

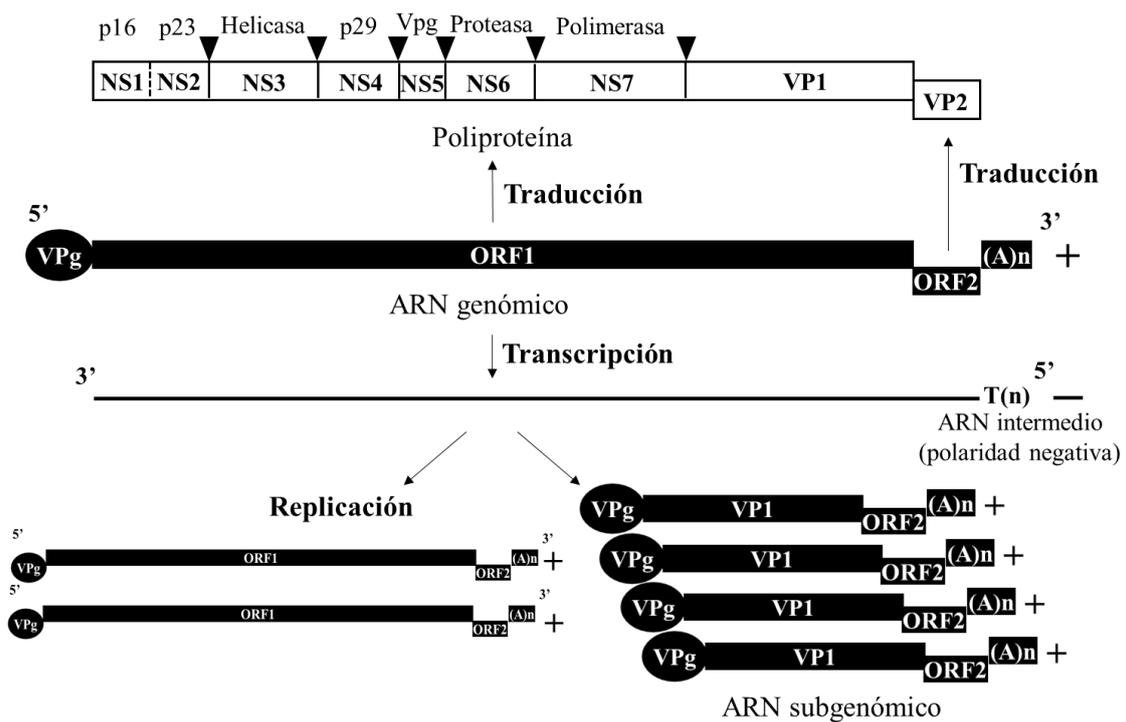


Figura 1. Representación esquemática de la organización genómica de RHDV. ORF1 codifica la poliproteína que es procesada proteolíticamente, en los sitios indicados con las puntas de flecha. El ORF2 da lugar la proteína estructural minoritaria VP2. A partir del ARN genómico se forman copias intermedias de polaridad negativa que permiten la generación de un elevado número de copias de ARN genómico y ARN subgenómico.

1.3.3. Filogenia y evolución del género *Lagovirus*: La nueva variante del virus RHDV

Hasta hace poco tiempo las cepas de RHDV se dividían en 6 genogrupos principales (G1-G6) (Le Gall-Reculé *et al.*, 2003). Además, hasta el año 2011 solo se describieron aislados del tipo G1 en la península Ibérica (Abrantes *et al.*, 2012b; Alda *et al.*, 2010; Muller *et al.*, 2009). En el año 2011, se registraron brotes de una nueva variante de RHDV que causó mortalidad en gazapos (Dalton *et al.*, 2012). Esta nueva variante parece estar relacionada con un aislado descrito en Francia en 2010 (Le Gall-Reculé *et al.*, 2011a). La nueva variante de RHDV, nombrado inicialmente como RHDV-Nav10/11 (Dalton *et al.*, 2012), se aisló a partir de muestras de hígado tomadas de gazapos procedentes de una granja de Navarra el año 2011. Los brotes surgidos en granjas que vacunaban a los animales frente a RHDV hizo sospechar que las vacunas disponibles en el mercado no protegían frente a esta variante de RHDV. En infecciones experimentales el aislado RHDV-Nav10/11 provocó la muerte de gazapos de 30 días de edad que mostraban infección en el intestino delgado (Dalton *et al.*, 2012), además de, en hígado y otros tejidos dónde se produce infección en la enfermedad por RHDV clásico (Ramiro-Ibáñez *et al.*, 1999). Hasta ahora, la nueva variante patogénica del virus RHDV que surgió en 2010 se llamó de diferentes formas: nueva variante de RHDV o RHDVFrance2010 (Le Gall-Reculé *et al.*, 2011a; 2011b; 2013; Puggioni *et al.*, 2013), RHDVb (Dalton *et al.*, 2012) o RHDV2 (Le Gall-Reculé *et al.*, 2013).

Estudios recientes de la capacidad de diseminación de la nueva variante dentro de la península ibérica demuestran que se ha extendido a un amplio número de provincias en un periodo de tiempo relativamente corto. El primer brote de la variante de RHDV se confirmó por secuenciación (Dalton *et al.*, 2012), y coincide con el diagnóstico clínico basado en gazapos muertos con síntomas de RHD que fueron previamente vacunados, en granjas Aragón y Navarra (Grasa y Malo, 2012). Aislados similares a RHDV-Nav10/11 han sido caracterizados por otros autores en conejos salvajes de la misma región de España (Calvete *et al.*, 2012). La alta concentración de muestras positivas que se analizaron en el Mediterráneo y en el Noreste de España (Dalton *et al.*, 2014) podría correlacionarse con la mayor concentración de granjas de conejo en esas áreas, que son áreas de producción intensiva o medio intensiva y criaderos especializados, en comparación con el sur del país que es una zona de baja producción. Los análisis de secuencias indican que los aislados están relacionados, sin embargo, algunos aislados en

zonas cercanas a la frontera francesa se diferencian en torno a 5- 6 % respecto a RHDV-Nav10/11 mientras que tienen más parentesco al aislado francés descrito (Le Gall-Reculé *et al.*, 2011a). Este virus emergente se ha establecido rápidamente como un importante problema para el conejo en la península Ibérica, reemplazando a las cepas del virus clásico que ya no se detectan en brotes de la enfermedad (Calvete *et al.*, 2014; Lopes *et al.*, 2015a).

Como virus ARN, el gen que codifica la proteína de la cápsida de RHDV tiene una alta tasa de sustitución de nucleótidos (Alda *et al.*, 2010; Eden *et al.*, 2015a; 2015b; Hicks y Duffy, 2012; Kerr *et al.*, 2009; Kinnear y Linde, 2010) aunque entre las cepas patogénicas de RHDV clásico existe menos del 10 % de divergencia en la secuencia de la proteína VP1. La recombinación, junto con la mutación, es un importante mecanismo para la evolución de estos virus ARN. En los últimos años se han identificado virus RHDV que contienen recombinaciones en diferentes zonas de su genoma. Ya se encontraron evidencias de recombinación en cepas de RHDV clásico (Abrantes *et al.*, 2008; Forrester *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2017). Pero, además, se ha descubierto que el mismo fenómeno ha ocurrido en la nueva variante del virus. En algunos casos el evento de recombinación ocurrió dentro de la región que codifica las proteínas no estructurales provocando una divergencia de aproximadamente el 13 % con respecto a cepas patogénicas y no patogénicas del virus, mientras que, la región codificante de las proteínas estructurales es similar a cepas del genogrupo G1 (clásico) (Lopes *et al.*, 2017). En otro caso, la recombinación ocurrió entre los genes no estructurales y el gen que codifica la proteína VP1 (Lopes *et al.*, 2015b). Un aislado recombinante de RHDVb disponible en nuestro laboratorio contiene las proteínas no estructurales del virus clásico perteneciente al genogrupo 1 y la proteína de la cápsida VP1 que pertenece a la nueva variante.

Recientemente, también en nuestro laboratorio se dispone de un aislado perteneciente a RHDVb nombrado como RHDV-Gal08/13 que, experimentalmente, se ha comprobado tiene una mayor virulencia con respecto a otros aislados de RHDVb que provocan el 50 % de mortalidad en gazapos y el 10 % en conejos adultos. En el caso de RHDV-Gal08/13 la tasa de mortalidad aumenta hasta un 100 % tanto en gazapos como adultos (datos no publicados). Puesto que no se han observado cambios importantes en la secuencia de la proteína VP1, se ha planteado hacer futuros estudios sobre las proteínas no estructurales del virus, que podrían ser las implicadas en el incremento de la virulencia, como, por ejemplo, la polimerasa que podría aumentar la capacidad replicativa del virus.

Debido a la elevada diversidad de lagovirus relacionada con la variación de la patogenicidad, distribución geográfica y rango de hospedación, hace poco tiempo se ha propuesto una nueva clasificación y nomenclatura para estos virus (Le Pendu *et al.*, 2017). Basándose en relaciones filogenéticas se establece una única especie de lagovirus llamada *Lagovirus europaeus* que incluye a dos genogrupos, uno de virus relacionados con RHDV y otro con virus relacionados con EBHSV. Según esta clasificación RHDV y los calicivirus no patogénicos (RCVs) conformarían el genogrupo I (GI) y, EBHSV y los lagovirus no patogénicos que infectan liebres (HaCV) (Cavadini *et al.*, 2016) pertenecerían al genogrupo II (GII). De este modo, en la **Tabla 1** se hace una correspondencia entre los aislados más importantes utilizados en este trabajo y la nomenclatura que se debería utilizar para nombrarlos. Aun así, dado que esta propuesta no ha sido aceptada por la ICTV, nos seguiremos refiriendo a los aislados de RHDV por su nombre particular, o por el genogrupo y tipo clásico o variante al que pertenecen.

Tabla 1. Concordancia de las nomenclaturas previas y la propuesta según Le Pendu *et al.*, 2017.

Nomenclatura corriente	Aislado utilizado en este trabajo	Nueva nomenclatura propuesta
RHDVb o RHDV2	RHDV-Nav10/11 RHDV-Gal08/13	GI.2/RHDV2/b
RHDV G1	RHDV-Ast89	GI.1b/RHDV
RHDVa o RHDV G6	RHDV-Gal09/12	GI.1a/RHDV

1.3.4. La cápsida viral

Los virus muestran una notable diversidad en la complejidad y organización de sus viriones. En su mayoría, las cápsidas de virus no envueltos se construyen a partir de subunidades de una proteína principal de la cápsida, MCP, que forma un oligómero simétrico, que determina el ensamblaje y la estructura del virión, y una o unas pocas proteínas de la cápsida minoritarias (Krupovic y Koonin, 2017). Como estrategia para infectar a sus hospedadores los virus deben mantener en la superficie de la cápsida regiones conservadas que permitan el reconocimiento de los receptores celulares del hospedador pero, a la vez, suficiente tasa de mutaciones en zonas superficiales que le

permitan evadir el sistema inmune del hospedador (Mateu, 1995). La estructura de la cápsida se basa en un fino equilibrio entre la estabilidad para proteger al genoma viral, en condiciones adversas, cuando se encuentra fuera de un hospedador y la suficiente debilidad que le permita liberar el genoma viral dentro de la célula hospedadora.

Como en los demás calicivirus, la cápsida de RHDV, que envuelve y protege a la molécula de ARN, está compuesta por 90 dímeros de VP1. Es una cápsida de pequeño tamaño (35-40 nm de diámetro) y tiene simetría icosaédrica T=3. Los 90 dímeros de VP1 tienen forma de arcos y generan 32 depresiones en forma de copa en la superficie de la cápsida (Valícek *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 2013) (**Figura 2A**). Cada monómero de VP1 se puede dividir en varios dominios estructurales (**Figura 2B y 2C**), un brazo N-terminal (NTA) situado hacia el interior de la cápsida, el dominio S que forma la parte interna de la cápsida denominada *shell* (en inglés, concha), y el dominio P o protruyente que corresponde al extremo carboxilo terminal (**Figura 2C**) y queda expuesto en la superficie externa del virión. Ambos dominios están separados por una pequeña región denominada

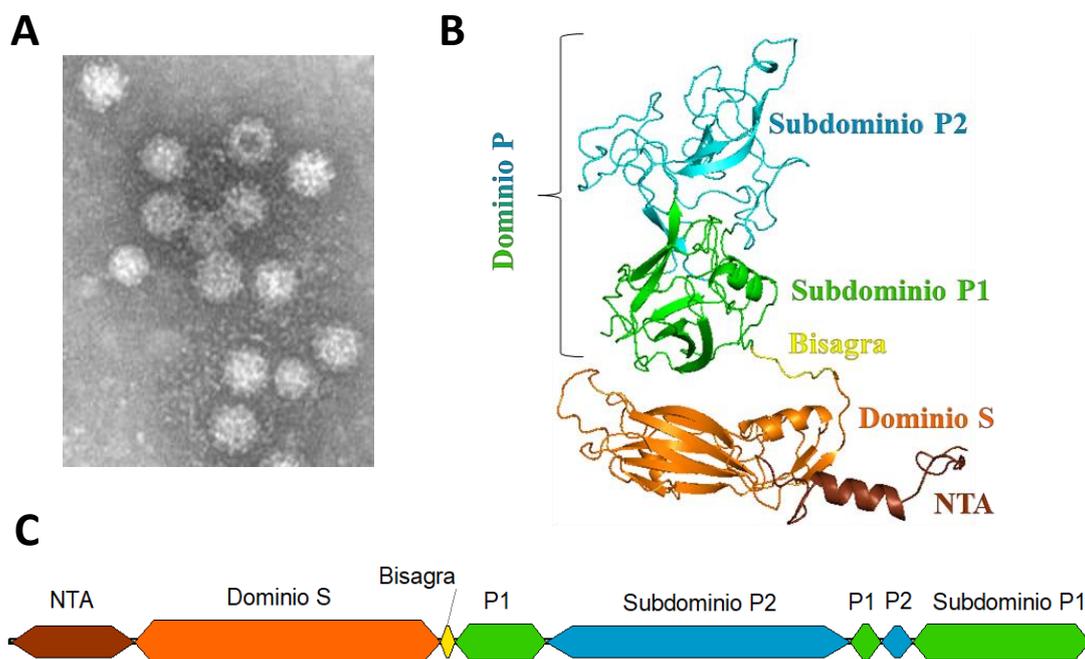


Figura 2. Estructura de la cápsida de RHDV y regiones de la proteína VP1. **A.** Imagen de microscopía electrónica de viriones de RHDV purificados a partir de un extracto de hígado de conejo infectado. **B.** Representación tridimensional de un monómero de la proteína VP1. **C.** Dominios estructurales de la proteína VP1 siguiendo el código de colores del modelo mostrado en B.

Ho bisagra (del inglés *hinge*) que les permite cierta flexibilidad en la disposición espacial de los dominios P y S (Wang *et al.*, 2013) (**Figura 2B**). El dominio P, a su vez, se puede subdividir en dos subdominios, subdominio P1 y P2 (Hu *et al.*, 2010).

La propiedad más importante que presenta la proteína VP1 es la capacidad de autoensamblarse, en ausencia de otros componentes del virión, y formar partículas similares al virus (VLPs o *virus-like particles*) (Laurent *et al.*, 1994; Nagesha *et al.*, 1999). Estas partículas son morfológica y antigénicamente similares a los viriones, por lo que son utilizadas en estudios de antigenicidad e interacción virus-hospedador, y muy especialmente son una importante herramienta para trabajar con virus que no son cultivables en cultivos celulares. El autoensamblaje de una cápsida viral es un proceso de oligomerización complejo que ocurre mediante interacciones ordenadas entre las proteínas participantes (Mateu, 2013). Gracias a las VLPs ha sido posible realizar estudios básicos de estructura y ensamblaje de las cápsidas de calicivirus (Bertolotti-Ciarlet *et al.*, 2002; Lindesmith *et al.*, 2014), haciendo posible la determinación de regiones importantes para el ensamblaje de la cápsida. Además, se ha demostrado que las proteínas VP1, encontrándose en distintos estados conformacionales quasi-equivalentes, son capaces de formar VLPs, además de formar VLPs que contienen varios epítomos heterólogos cuando se producen proteínas VP1 recombinantes (Luque *et al.*, 2012). Las inserciones de secuencias foráneas en la proteína VP1, más concretamente en los lazos del dominio P son capaces de acomodarse de modo que no impiden la formación de las VLPs (Bárcena *et al.*, 2004; Crisci *et al.*, 2009; Moreno, 2016). Esto puede indicar una alta flexibilidad de los lazos del dominio P que facilitarían la interacción con los receptores del hospedador (Katpally *et al.*, 2008; Taube *et al.*, 2010). Además, la generación de VLPs que contienen epítomos heterólogos abre multitud de posibilidades para nuevas estrategias vacunales frente a infecciones virales (Bárcena y Blanco, 2013; Kushnir *et al.*, 2012; Plummer y Manchester, 2011).

La producción de VLPs y generación de anticuerpos monoclonales frente a ellas en ratón ha permitido el desarrollo de herramientas diagnósticas frente a distintos calicivirus (Almanza *et al.*, 2008; Deng *et al.*, 2003) y, más concretamente, frente a RHDV, que recientemente se han desarrollado (Bárcena *et al.*, 2015; Dalton *et al.*, 2018c) e incluso comercializado (Dalton *et al.*, 2017). Además, la generación de anticuerpos monoclonales frente a VLPs ha contribuido, en el presente trabajo, a un mayor conocimiento de la

antigenicidad de la proteína VP1, y la posibilidad de diseñar nuevas estrategias para producir vacunas frente a la nueva variante de RHDV.

Para resumir, hay que destacar que un mayor conocimiento de la cápsida de la nueva variante de RHDV, así como de la proteína VP1 que la forma, puede ayudar a mejorar los sistemas de diagnóstico y vacunación disponibles actualmente frente a la nueva variante de RHDV. Esto podría ampliar el rango de detección a posibles variantes o mutantes y recombinantes del virus, así como la producción de vacunas que protejan frente a las cepas más virulentas del virus.

1.3.5. Regiones antigénicas de la proteína principal de la cápsida (VP1)

La proteína VP1 de RHDV es reconocida por el sistema inmune de los conejos, jugando un papel muy importante en la inducción de la respuesta inmune frente a la infección por el virus (Viaplana *et al.*, 1997). En cuanto a los dominios o regiones en los que se subdivide la proteína VP1, mediante alineamientos de secuencias entre aislados pertenecientes a distintos RHDV se observan distintos grados de identidad dependiendo del dominio considerado (**Figura 3**). En el caso del dominio N-terminal, situado hacia el interior de la cápsida viral, el porcentaje de identidad entre RHDV-G1 (RHDV) y RHDVa es de 96,9 %, mientras que entre cada uno de esos y el virus de la nueva variante es de 90,8 % y 87,7 %, respectivamente (**Figura 3A**). Con respecto al dominio S, curiosamente, los porcentajes de identidad son más elevados, siendo entre los virus RHDV y RHDVa

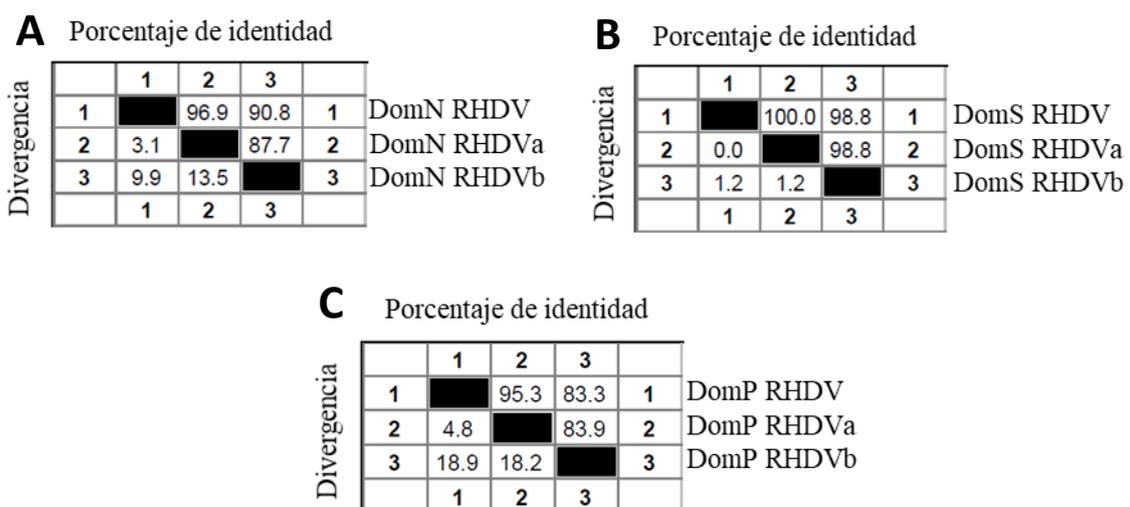
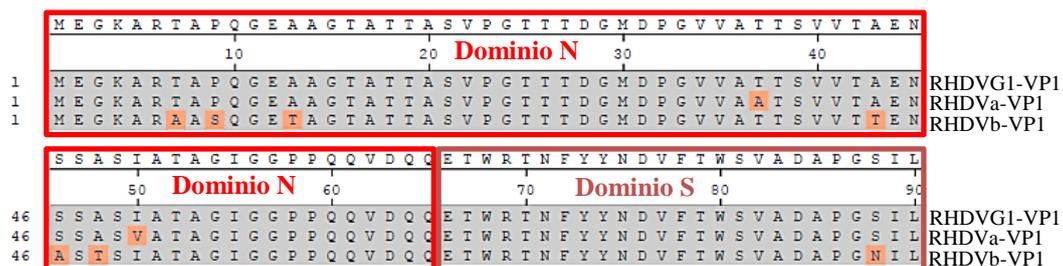


Figura 3. Porcentajes de identidad entre los dominios de distintos RHDV. **A.** Secuencias proteicas del dominio N-terminal. **B.** Secuencias de aminoácidos del dominio S. **C.** Secuencias proteicas del dominio P.

del 100 %, y entre estos virus y la nueva variante del 98,8 % (**Figura 3B**). En cuanto a la identidad de secuencias de los dominios P entre distintos RHDV, los porcentajes disminuyen, siendo del 95,3 % entre RHDV y RHDVa, y entre estos y la nueva variante se reduce la homología hasta 83,3 % y 83,9 %, respectivamente (**Figura 3C**).

Un reciente modelo pseudoatómico de la cápsida de RHDVa (Wang *et al.*, 2013) ha mostrado que la secuencia del dominio S de la proteína VP1 tiene un elevado porcentaje de homología entre calicivirus y que, como consecuencia, la estructura tridimensional adquirida es bastante parecida entre estos virus. Esto sugiere, junto con los datos de secuencias de RHDV (**Figura 3B**) que la parte interna o *shell* de las cápsidas de estos virus se encuentra altamente conservada, tanto entre dentro de los RHDV como entre los calicivirus.

En calivirus, mediante la técnica de cristalografía de rayos X con VLPs se ha comprobado que el subdominio P2 se encuentra en las regiones protuberantes hacia el exterior de la cápsida. Es una región cuya estructura está conservada a grandes rasgos en los diferentes calicivirus, pero que, a la vez, es la región con mayor variabilidad en la secuencia de proteína, incluso entre las cepas de un mismo virus. Además, se ha comprobado que dentro de lazos expuestos a la superficie del subdominio P2 se encuentran numerosos epítomos neutralizantes de calicivirus (Katpally *et al.*, 2008; Kolawole *et al.*, 2014; Lochridge y Hardy, 2007; Smith, 2011; Tohya *et al.*, 1997), así como su importancia en la unión del virus a su receptor celular (Bhella y Goodfellow, 2011; Chen *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2008; Katpally *et al.*, 2010; Lochridge *et al.*, 2005; Ossiboff *et al.*, 2010; Prasad *et al.*, 1999; Shanker *et al.*, 2014; Tan *et al.*, 2004a; Taube *et al.*, 2010). En alineamientos de secuencias de la proteína VP1 de aislados pertenecientes a distintos tipos de RHDV, se puede confirmar que la mayor cantidad de cambios en la secuencia se concentran dentro del dominio P y, concretamente, dentro del subdominio P2 (**Figura 4**).



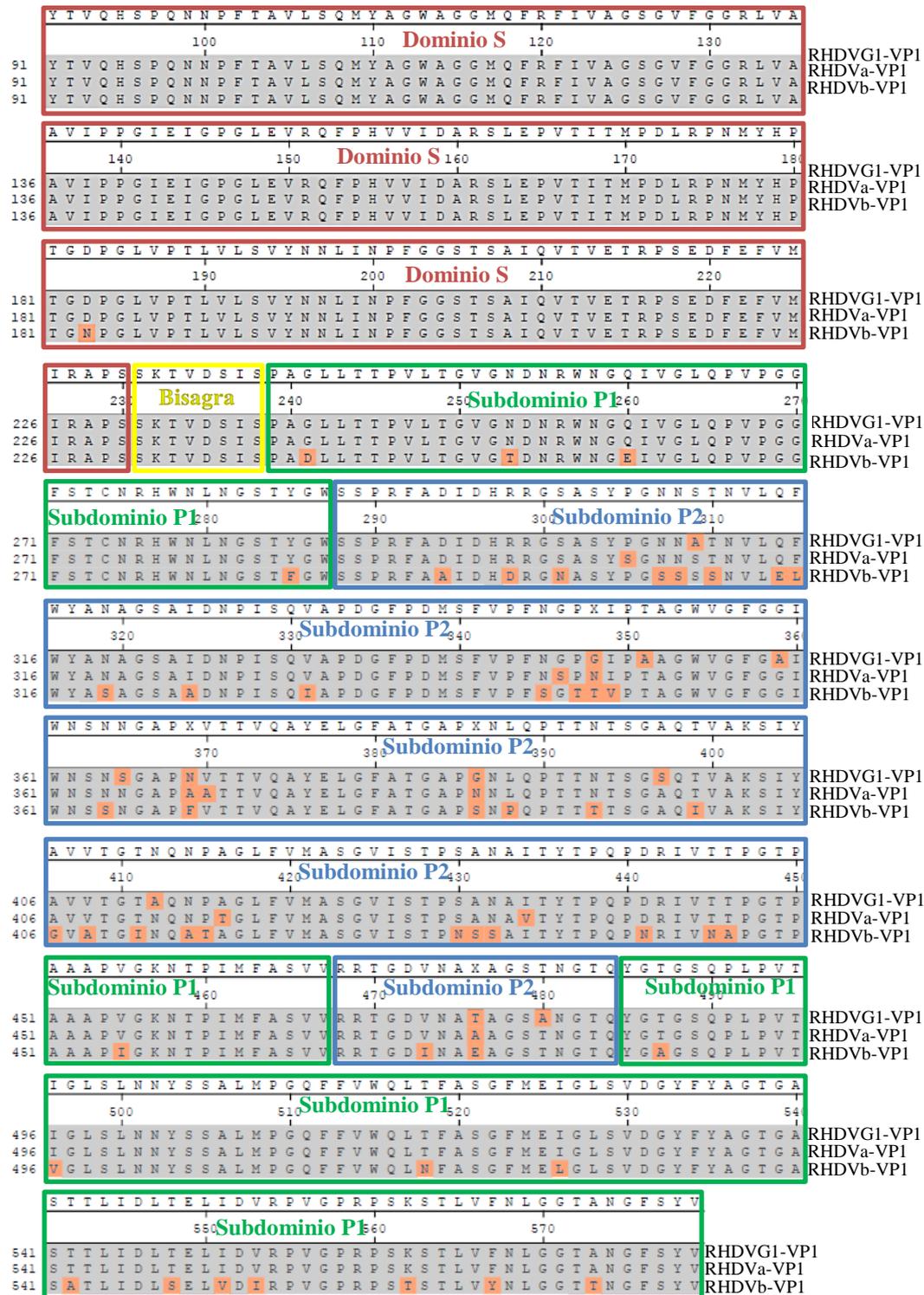


Figura 4. Alineamiento de secuencias de la proteína VP1 de distintos RHDV. Se muestran las secuencias del aislado RHDV-Ast89 (RHDVG1) perteneciente al genogrupo G1, de una cepa de RHDVa (RHDVa-Rossi) perteneciente al genogrupo G6 y de RHDV-Nav10/11 (RHDVb) de la nueva variante. Aparecen indicados mediante recuadros las regiones de las secuencias correspondientes a cada uno de los dominios y subdominios de la proteína VP1. Los residuos aminoacídicos diferentes aparecen sombreados en naranja.

Además, basándose en alineamientos de secuencias de distintos RHDV, dentro del subdominio P2 de RHDVa identificaron siete regiones de variaciones de la secuencia. Esas zonas del dominio P podrían corresponder a regiones determinantes que influyen en las diferencias de unión específica a HBGAs (antígenos del grupo sanguíneo) e interacción con las células de conejo que existen entre los virus RHDV clásicos o la nueva variante del virus (RHDVb) (Wang *et al.*, 2013) (**Figura 5A**). Teniendo en cuenta esto, y considerando que la inmunización con un péptido basado en una de esas secuencias provocó una respuesta inmune protectora frente al virus (Wang *et al.*, 2013), en el presente trabajo hemos considerado la posibilidad que ocurra lo mismo en la nueva variante del virus y que la inmunización con el péptido correspondiente a la misma región en RHDV-Nav10/11 genere una respuesta en los conejos que los proteja frente a la infección con el virus.

Centrándonos en el dominio P de RHDV, recientes estudios han comprobado que estos dominios expresados de forma heteróloga en bacterias, purificados y cristalizados son capaces de formar dímeros de forma similar a como se disponen en la cápsida del virus. También mediante cristalografía de rayos X fueron determinadas las estructuras de los dominios de los aislados RHDV-Ast89 (RHDV-G1) y RHDV-Nav10/11 (RHDVb), pertenecientes al genogrupo 1 del virus clásico y a la nueva variante, respectivamente (Leuthold *et al.*, 2015). Se comprobó que, como ya se sabía, los cambios genéticos más importantes entre los virus RHDV clásicos y la nueva variante se concentran en el subdominio P2 de la proteína VP1. Los modelos de dímeros de estos dominios P, junto con los de RHDVa (Wang *et al.*, 2013) presentan estructuras similares incluidos los lazos extendidos del subdominio P2, aunque sí varían en su orientación, lo que podría estar provocando los cambios antigénicos (Leuthold *et al.*, 2015) (**Figura 5B**). Dado que el subdominio P2 parece ser la región de la proteína VP1 que se une a los receptores del hospedador (Bhella *et al.*, 2008), los cambios antigénicos y de reactividad con HBGAs que presenta la nueva variante del virus podrían explicar la alteración del tropismo en cuanto a la edad y tejidos del hospedador que tiene este virus con respecto a los virus clásicos (G1 y RHDVa).

Como ya se ha dicho, el cambio en la patogenicidad de la nueva variante del virus RHDV sugiere cambios antigénicos en la proteína de la cápsida que supongan diferencias en la unión del virus con la célula hospedadora. Esto ha sido en parte demostrado por las diferencias en la capacidad hemaglutinante de la variante con respecto al virus clásico

(Dalton *et al.*, 2012). Recientemente, mediante estudios de producción de anticuerpos monoclonales frente a dos tipos distintos de RHDV, se ha comprobado que la mayoría de los epítomos que generan anticuerpos monoclonales específicos se encuentran en el subdominio P2 (Kong *et al.*, 2016). Esto demuestra que un profundo estudio de la antigenicidad del dominio P de RHDVb puede llevar al desarrollo de mejores herramientas diagnósticas y vacunas más eficientes frente a esta nueva variante.

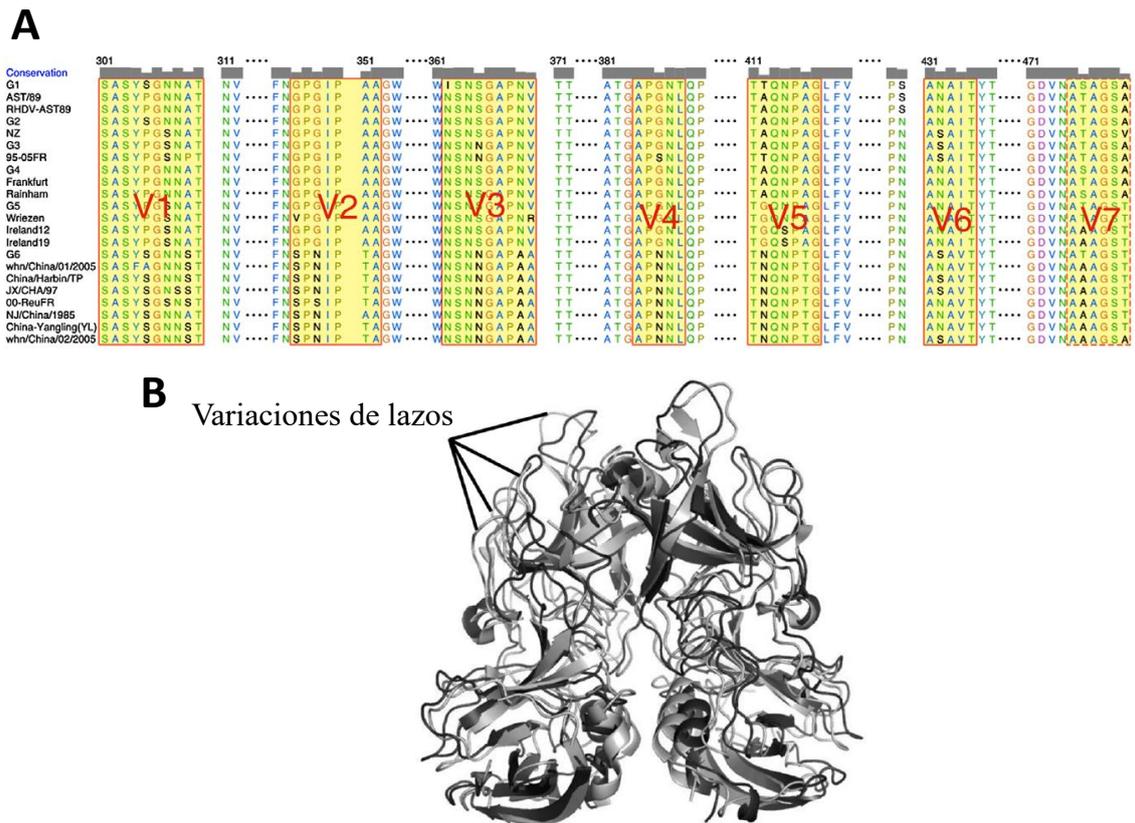


Figura 5. Regiones variables y estructura del dominio P de RHDV. **A.** Alineamiento de secuencias de VP1 de RHDV tomado de Wang *et al.*, 2013 que muestra en amarillo las que describe como regiones variables y potencialmente antigénicas. **B.** Superposición de los dímeros de dominios P de RHDV a (gris claro) y RHDVb (gris oscuro), tomada de Leuthold *et al.*, 2015.

En el caso de RHDV clásico, mediante la inmunización de distintas especies animales (cerdo, conejo y ratón) con VLPs se determinaron regiones inmunodominantes dentro del subdominio P2. En dicho trabajo se estableció que el lazo L1 es una importante región antigénica y muy útil para la inserción en ella de epítomos heterólogos. Sin embargo, de las tres regiones que se estudiaron fue la correspondiente a una parte del lazo 2 la que generó una mayor reactividad en las tres especies de animales utilizadas. Además, esta

región comprendida entre los residuos de aminoácidos 330 y 334 se localiza hacia el exterior y fácilmente accesible en la superficie de la VLP (Moreno, 2016).

Las vacunas disponibles actualmente frente a la enfermedad hemorrágica del conejo que fueron generadas frente al virus clásico (RHDV-G1), tienen baja eficiencia frente a la nueva variante del virus (Dalton *et al.*, 2012; Le Gall-Reculé *et al.*, 2011b). Por esto es necesario conocer los determinantes antigénicos de esta nueva variante que pueden ser importantes para el diseño de nuevas vacunas más eficientes. Además de ser un estudio básico para la generación de herramientas diagnósticas más potentes, que tengan un rango de detección mayor frente a variantes del virus o mutantes.

1.4. ESTRATEGIAS VACUNALES

1.4.1. Vacunas clásicas

Las vacunas son la forma más eficaz para prevenir y combatir la enfermedad hemorrágica del conejo, como ocurre con cualquier enfermedad infecciosa. Las vacunas utilizadas en la actualidad, en su mayoría, consisten en formas inactivadas del virus RHDV que generan una potente respuesta inmune tanto humoral (inducción de linfocitos B) (Henning *et al.*, 2005) como celular (inducción de linfocitos T), que se traduce en la protección frente a la infección (Huang, 1991; Plotkin, 2005). En el caso de RHDV, y como ocurre en calicivirus que no pueden propagarse en cultivos celulares, la obtención de virus para preparar las vacunas inactivadas supone la necesidad de realizar infecciones experimentales de animales. Una vez han sido infectados por el virus y pasado cierto tiempo, los órganos donde se concentran la mayor carga viral (hígado y bazo) son recogidos, homogeneizados y tratados para inactivar al virus (Huang, 1991). La inactivación puede realizarse de distintas formas mediante la adición de: etilenimina binaria (BEI) (ERAVAC, Hipra), solución de formaldehído 35 % (Pestorin Mormyx, Bioveta, a. s.) o formalina (Huang, 1991).

Existen varias vacunas comerciales frente al virus clásico RHDV basadas en extractos de hígados de conejos infectados, seguido de la inactivación química del virus, demostrándose su eficacia incluso frente a la variante RHDVa clásica (Argüello, 1991; Read y Kirkland, 2017; Schirrmeyer *et al.*, 1999; Smíd *et al.*, 1991). Sin embargo, la falta de protección frente a la nueva variante inmunizando con estas vacunas (Bárcena *et al.*,

2015; Dalton *et al.*, 2014), sugiere la necesidad de diseñar vacunas específicas frente a esta nueva variante del virus.

En 2016, se comercializó en España la vacuna frente a la nueva variante RHDVb producida mediante el procedimiento clásico, llamada *ERAVAC* (*Laboratorios Hipra S.A.*). Una vacuna que combina dos tipos de virus inactivados (clásico y nueva variante) está disponible desde 2017, *Filavac VHD K C+V* (*FILAVIE, F Roussay*), producida en Francia como la primera vacuna generada frente a RHDVb pero que no se importó hasta 2017 bajo una licencia especial. Además, con la autorización nacional, en España se encuentran disponibles las vacunas frente al virus RHDVb, *Novarvilap* (*Laboratorios Ovejero*) y *Cunipravac RHD variant* (*Hipra*).

A pesar de la demostrada eficacia de las vacunas clásicas para producir una respuesta inmune protectora frente a los virus RHDV, la inaceptable práctica de infectar experimentalmente conejos para producirlas es la principal desventaja que presentan. Es por lo que los avances más inmediatos se centran en la producción de vacunas basadas en antígenos de la cápsida de RHDV (como la proteína VP1 completa o dominios de ella) producidos en el laboratorio y que, utilizando sistemas de expresión en cultivos celulares o larvas de insecto, permitirán evitar el procedimiento clásico para conseguir vacunas frente RHDV.

1.4.2. Vacunas basadas en VLPs

La VLP, como se ha explicado anteriormente, conforma una partícula muy similar al virus en cuanto a su superficie exterior dónde se encuentran los antígenos virales, lo que les confiere un importante potencial inmunogénico para utilizarlas como antígenos vacunales frente a los virus correspondientes. Además, suponen un avance muy importante en la producción de vacunas *in vitro* frente a virus como el RHDV, evitando la desagradable práctica de hacer infecciones experimentales de animales.

La utilidad de las VLPs de RHDV como antígeno vacunal está más que demostrada por la producción de anticuerpos específicos frente al virus y la protección frente a la infección, en conejos inmunizados con este antígeno expresado de distintas formas. Los sistemas de expresión heteróloga de la proteína VP1 de RHDV para la producción de antígeno vacunal, han sido muy variados, desde bacterias (Boga *et al.*, 1994; Guo *et al.*, 2016), baculovirus (Laurent *et al.*, 1994; Marín *et al.*, 1995; Nagesha *et al.*, 1995; Pérez-

Filgueira *et al.*, 2007; Plana-Duran *et al.*, 1996), levaduras (Boga *et al.*, 1997; Fernandez *et al.*, 2013), plantas (Castañón *et al.*, 1999; Fernández-Fernández *et al.*, 2001; Gil *et al.*, 2006; Mikschofsky *et al.*, 2009), o adenovirus (Fernandez *et al.*, 2011), hasta en forma de vacuna bivalente con virus mixoma recombinantes (Angulo y Bárcena, 2007; Bárcena *et al.*, 2000; Bertagnoli *et al.*, 1996; Spibey *et al.*, 2012; Torres *et al.*, 2000).

Uno de los sistemas de producción de VLPs *in vitro* más prometedores son los baculovirus sobre los que se han hecho estudios de mejora de producción (López-Vidal *et al.*, 2015), incluso se ha escalado la expresión de la proteína VP1 a lo que serían factorías vivas más complejas que los cultivos celulares como son larvas de insectos (*Trichoplusia ni*) infectadas por baculovirus (Pérez-Filgueira *et al.*, 2007).

Recientemente, dada la importancia de las pérdidas económicas y ecológicas producidas por la nueva variante de RHDV, los estudios de producción de vacunas basadas en VLPs se han centrado en la expresión de la proteína VP1 de RHDVb. La generación y caracterización de VLPs de RHDVb frente a VLPs de RHDV confirmaron las diferencias antigénicas mostradas por ambos virus, lo que coincide con la falta de protección eficiente frente a la nueva variante de las vacunas comerciales disponibles para RHDV clásico (Bárcena *et al.*, 2015). De nuevo, se pone de manifiesto la necesidad de utilizar antígenos de la nueva variante para el desarrollo de herramientas diagnósticas y vacunas eficientes frente a ella.

En un estudio muy reciente (Müller *et al.*, 2019) se han producido VLPs de RHDVb (cepa 10-05 aislada en Francia en 2010, Le Gall-Reculé *et al.*, 2013) mediante el sistema de expresión en baculovirus de la proteína VP1. Además, hay que destacar que la vacunación de conejos con estas VLPs de RHDVb indujeron una respuesta protectora frente a la infección por el virus. Este trabajo supone una confirmación más de la posibilidad de generar vacunas basadas en VLPs frente a la nueva variante de RHDVb, dejando atrás la metodología poco ética de la generación de vacunas inactivadas.

1.4.3. Vacunas basadas en VLPs quiméricas de RHDV

Las VLPs quiméricas se forman a partir de la expresión de la proteína VP1 de RHDV recombinante que contiene en su secuencia uno o varios epítomos heterólogos, que pueden encontrarse en distintas regiones de VP1 y, por tanto, situarse en diferentes partes de las VLPs.

El uso potencial y la versatilidad de VLPs de RHDV quiméricas como vectores vacunales ha sido ampliamente demostrado (Bárcena y Blanco, 2013; Crisci, E *et al.*, 2012; 2015; Luque *et al.*, 2012; Moreno, 2016). En los estudios de vacunación con VLPs quiméricas que contienen epítomos B heterólogos se ha comprobado que son capaces de inducir en ratones una respuesta inmune protectora y la generación de anticuerpos neutralizantes específicos frente al virus al que pertenecen los epítomos heterólogos (Moreno, 2016). A su vez, se ha demostrado la elevada tolerancia que tienen las VLPs de RHDV frente a la inserción de varios epítomos heterólogos, al menos en las regiones probadas dentro del dominio P de VP1, concretamente dentro del lazo 1 del subdominio P2. En el caso de epítomos T heterólogos insertados en VLPs quiméricas de RHDV dentro del extremo N-terminal (NTA) también se ha demostrado la inducción de una respuesta inmune celular (Crisci *et al.*, 2009; Crisci, E *et al.*, 2012).

En el caso de la vacunación frente al propio virus RHDV, sería importante pensar en la posibilidad que estos estudios sobre VLPs quiméricas abren a la generación de vacunas polivalentes, como podría ser VLPs que contengan determinantes antigénicos de distintos RHDV, de modo que se puedan inmunizar conejos frente a distintas variantes de RHDV al mismo tiempo y de forma efectiva.

1.4.4. Péptidos sintéticos como antígenos vacunales

En general, las vacunas peptídicas suelen dar una leve inmunogenicidad en los individuos vacunados, con respecto a si se usa el patógeno completo. Por tanto, se utilizan potentes adyuvantes, altas dosis de péptido, vacunaciones repetitivas o la conjugación con inductores del sistema inmune (Gil *et al.*, 2011). Estos “carriers” con los que se pueden conjugar los péptidos son de naturalezas y orígenes muy variados, como la proteína KLH (Keyhole Limpet Haemocyanin) (Kantele *et al.*, 2011), el polisacárido AG (arabinogalactano) (Huang *et al.*, 2016) u oligodeoxinucleótidos con motivos CpG no metilados (Bode *et al.*, 2011).

En algunos casos estudiados se ha comprobado la efectividad de las vacunas peptídicas para producir una respuesta inmune protectora en los animales frente al virus correspondiente (Langeveld *et al.*, 1994). Incluso la inmunización con un péptido neutralizante de sólo 14 aminoácidos conjugado con KLH se ha sugerido como un candidato vacunal frente a parvovirus de perro (Langeveld *et al.*, 1995).

En el caso del virus RHDV, Wang *et al.*, (2013), realizaron una inmunización de conejos con un péptido correspondiente a la secuencia del lazo 1 (L1) del subdominio P2 de RHDVa. El péptido fusionado a la proteína KLH demostró la inducción del sistema inmune de los animales, protegiéndolos de la infección por el virus, además de la generación de anticuerpos frente a la proteína de la cápsida.

Esto podría suponer una prueba de la eficacia de vacunas peptídicas basadas en las regiones antigénicas del subdominio P2 de RHDV. Por ello, en el presente trabajo, se ha realizado una prueba centrada en la vacunación frente a la nueva variante de RHDV mediante una inmunización con un péptido, basado en la secuencia del lazo 1 del aislado RHDV-Nav10/11 y conjugado con la proteína KLH.

1.4.5. Bacterias lácticas como vacunas vivas

Los lactobacilos son bacterias Gram positivas que se usan comúnmente para la conservación y fermentación de la comida. Además, constituyen una parte de la microbiota natural humana y, generalmente, se consideran seguros para humanos. Actualmente, ha aumentado el interés en el desarrollo de lactobacilos modificados como sistema de liberación de biomoléculas terapéuticas y profilácticas (Hanniffy *et al.*, 2004; Wells y Mercenier, 2008). Por otro lado, recientes resultados han mostrado el potencial de lactobacilos para secretar fragmentos variables de una sola cadena y dominios variables de la cadena pesada de anticuerpos de llama para reducir infecciones orales y gastrointestinales en modelos animales (Krüger *et al.*, 2002; Marcotte *et al.*, 2008; Pant *et al.*, 2006).

La estabilidad y seguridad de los lactobacilos modificados genéticamente usados con aplicaciones médicas es la mayor preocupación. Varios sistemas se han desarrollado para la integración estable de genes heterólogos en el cromosoma, generando sistemas de expresión dependientes de nutrientes y evitando así los genes de selección mediante antibióticos (Hanniffy *et al.*, 2004). Las proteínas recombinantes pueden ser secretadas al medio ambiente o ser expuestas en la superficie celular mediante uniones covalentes (Krüger *et al.*, 2002; Oggioni *et al.*, 1999; Wells y Mercenier, 2008) o no covalentes (Åvall-Jääskeläinen *et al.*, 2002; Turner *et al.*, 2004).

Alguno de los sistemas de expresión integrados en el cromosoma de lactobacilos se basa en el gen que codifica el factor promotor de agregación (*apf*) de *Lactobacillus*

crispatus (Marcotte *et al.*, 2004) para dirigir la expresión y secreción de fragmentos de anticuerpos, combinados con aparatos de integración sitio-específico del bacteriófago atemperado A2, para mediar la integración cromosomal (Martín *et al.*, 2000; Martín *et al.*, 2011). La proteína APF ha sido identificada en lactobacilos homofermentativos pero proteínas con la parte carboxilo terminal homóloga a APF están presentes en lactobacilos heterofermentativos y otras bacterias Gram positivas (Marcotte *et al.*, 2004; Turner *et al.*, 2004). Esta proteína fue inicialmente descrita por su papel en la autoagregación, pero más recientemente se ha descubierto que está implicada en el mantenimiento de la forma celular (Jankovic *et al.*, 2003; Ventura *et al.*, 2002). La proteína APF se utiliza como vector molecular para la producción de fragmentos de anticuerpos debido a su alto nivel de secreción al sobrenadante y sistema de anclaje no covalente a la pared celular (Jankovic *et al.*, 2003; Marcotte *et al.*, 2004; Ventura *et al.*, 2002).

En estudios basados en la tecnología recombinante con bacterias lácticas se describió que la producción en lactobacilos de fragmentos de anticuerpo frente a la adhesina SAI/II de *Streptococcus mutans*, protegía frente a caries. Más recientemente, para la optimización de la expresión, producción y la localización del fragmento de anticuerpo se han diseñado nuevos casetes de expresión que incluyen nuevas regiones entre las secuencias que codifican los fragmentos de anticuerpo y el gen *apf* (Martín *et al.*, 2011). En la vacunación frente a calicivirus, se obtuvo un sistema de expresión en lactobacilos recombinantes que expresaba una proteína antigénica de un norovirus, lo que abría la posibilidad de la producción de vacunas orales frente a virus entéricos (Martín *et al.*, 2004).

Uno de los principales problemas a la hora de combatir la enfermedad hemorrágica del conejo en entornos salvajes es que no existe la posibilidad de vacunar los conejos salvajes sin que ello suponga la captura y el estrés que conlleva para el animal. La vacunación oral es una alternativa muy válida para evitar este problema, además se ha comprobado en varios estudios que realizándola con distintos antígenos vacunales es capaz de inducir una respuesta protectora en conejos (Bertagnoli *et al.*, 1996; Gil *et al.*, 2006). Recientemente, se ha conseguido la expresión de la proteína VP1 de RHDV en una cepa atenuada de *Salmonella typhimorium*, y tras su administración oral, ha sido comprobada la inducción de protección frente a un aislado de RHDV clásico (Deng *et al.*, 2019). Esto indica la posibilidad de utilizar bacterias como vectores vacunales.

El desarrollo de una vacuna oral que se pueda administrar fácilmente a las poblaciones salvajes y que tenga palatabilidad suficiente para ser ingerida voluntariamente por los conejos es importante. Por esto, hemos centrado parte del trabajo desarrollado en diseñar y estudiar bacterias lácticas que son capaces de expresar un posible antígeno vacunal frente a RHDV y, que podrían ser administradas en bebederos o a través de cebos con pienso. Además, como se sabe que los lactobacilos son bacterias típicas de la microbiota intestinal cabría la posibilidad de que colonizaran el intestino de los conejos y mantuviesen la exposición del animal al antígeno durante más tiempo.

1.4.6. Vacunas marcadas

La diferenciación de conejos vacunados o expuestos al virus circulante supone, hoy en día, un auténtico problema. Al igual que la incapacidad para determinar si un animal está vacunado frente a una u otra variante del virus RHDV. Para esto sería necesario poder diferenciar en sueros de animales anticuerpos que se han producido frente a un antígeno vacunal o tras una infección natural por el virus. Es debido a esto la importancia, no solo de desarrollar mejores herramientas diagnósticas, sino también el diseño de antígenos vacunales marcados que generen una respuesta diferenciable frente al antígeno original del virus.

En ensayos de inmunización con vacunas marcadas se ha comprobado que los animales son capaces de generar anticuerpos específicos frente a la molécula que se utiliza como marcaje, como puede ser una cola de 6 histidinas (Rai *et al.*, 2016).

En el caso de las vacunas con VLPs, se ha comprobado que sería posible el marcaje con cola de histidinas sin que afectase a la estructura de la partícula, para el seguimiento del suministro de vacunas en animales (Koho *et al.*, 2015). Además, se ha demostrado que la administración de VLPs con antígenos heterólogos expuestos en su superficie induce la producción de títulos altos de anticuerpos frente a dichos antígenos (Peacey *et al.*, 2007). En un estudio sobre la generación de un virus mixoma recombinante que contenía la proteína VP1 de RHDV (Bárcena *et al.*, 2000), se introdujo como marcador de la vacuna un epítipo lineal de la nucleoproteína del virus de la gastroenteritis transmisible (TGEV). Los resultados obtenidos demostraron la posibilidad de diferenciar a los animales inmunizados con el virus recombinante marcado del resto de animales.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Tomando en consideración los antecedentes expuestos anteriormente, el presente proyecto de tesis doctoral tiene como principales objetivos el estudio de la estructura antigénica de la cápsida del virion de la nueva variante del RHDV (RHDVb), y el desarrollo y evaluación de distintos antígenos vacunales efectivos frente a este virus. Por tanto, para el desarrollo de este trabajo de tesis doctoral nos hemos propuesto los siguientes objetivos concretos:

A. Caracterización antigénica de la proteína principal de la cápsida (VP1) de la nueva variante del RHDV (RHDVb).

Se llevará a cabo mediante la clonación de fragmentos parciales solapantes de la proteína VP1 de RHDV-Nav10/11. Dichos antígenos serán empleados en la caracterización de las librerías de anticuerpos monoclonales producidos frente a dos tipos de VLPs diferentes, pertenecientes a RHDVa o RHDVb. Se determinará la especificidad de esos anticuerpos frente a alguno o varios tipos de RHDV, así como el epítipo dentro de la proteína VP1 dónde interacciona.

B. Análisis de la interacción de un anticuerpo monoclonal específico frente a la nueva variante, con su epítipo dentro de la proteína VP1.

El estudio se centrará en un anticuerpo monoclonal que detecta específicamente la nueva variante de RHDV. La determinación de la región de VP1 dónde interacciona se ayudará de distintas técnicas de inmunodetección y de herramientas para la generación *in silico* de modelos probables de interacción antígeno-anticuerpo. Concretamente, se realizarán ensayos de competición con péptidos sintéticos, así como estudios de interacción con construcciones mutantes de la región de la proteína VP1 con la que interacciona para determinar la secuencia del epítipo. Por otro lado, se evaluará la capacidad de este anticuerpo monoclonal para neutralizar al virus. Combinaciones de este anticuerpo monoclonal con otros generados en este trabajo serán empleadas para el diseño de herramientas diagnósticas específicas frente a RHDVb.

C. Diseño, producción y evaluación de candidatos vacunales frente a la nueva variante de RHDV (RHDVb)

Los distintos candidatos vacunales se diseñarán y producirán basándonos en estrategias de expresión muy diferentes. En primer lugar, se diseñará una fusión con KLH

de un péptido sintético correspondiente a una zona predicha como antigénica del dominio P de VP1. Por otro lado, se producirán como posibles vacunas vivas orales, lactobacilos recombinantes que expresan dominios P de RHDV en distintas formas. El propio dominio P de la proteína VP1 de RHDV-Nav10/11 (RHDVb) se generará en forma de proteína de fusión con GST como otro posible antígeno vacunal. Adicionalmente, VLPs de RHDVb se purificarán a partir de cultivos celulares de insecto para su uso como candidato vacunal. Por último, todos los antígenos vacunales previamente generados serán probados en experimentos *in vivo* con conejos para la evaluación de su eficacia frente a la infección por el virus.

Material y Métodos

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1. Virus

El virus RHDV-Gal08/13 utilizado en las infecciones experimentales de conejo se obtuvo a partir de extractos de hígado de conejos previamente inoculados con un aislado procedente de un brote en Galicia, facilitado por el laboratorio central de veterinaria (LCV) en Madrid (España). El stock vírico se comprobó previamente mediante secuenciación y técnicas de hemaglutinación que demuestran su pertenencia a la nueva variante del virus RHDV (RHDVb).

En cuanto a la nomenclatura empleada para los aislados víricos de RHDV utilizados o nombrados en el presente trabajo, en la **Tabla 2** se muestran los distintos nombres que pueden usarse y, concretamente, el que se utilizará de aquí en adelante en esta tesis.

Tabla 2. Nomenclatura de los aislados víricos utilizados en el presente trabajo.

Nombre del aislado	Genogrupo o variante al que pertenece	Nombre abreviado utilizado
RHDV-Gal08/13	RHDVb	Gal08/13
RHDV-Nav10/11	RHDVb	Nav10/11
RHDV-Ler11/16-1	RHDVb	Ler11/16-1
RHDV-Ger06/12-2	RHDVb	Ger06/12-2
RHDV-Ast89	RHDV-G1	Ast89
RHDV-Gal09/12	RHDVa o RHDV-G6	Gal09/12

Cuando nos referimos a virus clásicos de RHDV, se incluye a los virus pertenecientes a RHDV-G1 y RHDV-G6 que eran los que se aislaban antes que apareciera la nueva variante (RHDVb).

3.1.2. Animales

Para la producción de anticuerpos monoclonales frente a VLPs se inmunizaron ratones BALB/c procedentes de Charles River Laboratories (Massachusetts, EE.UU.).

En los experimentos de vacunación y retos virales con conejos se utilizaron animales de la raza NZW procedentes de la Granja Cunicola San Bernardo (Navarra, España; CIF: B31286693). La edad de los conejos varía en función del experimento considerado, en

algunos casos se utilizaron gazapos de edad aproximada de 30 días y en otros casos fueron conejos adultos de tres meses de edad (vacunación oral con lactobacilos recombinantes).

3.1.3. Muestras de hígados

Los extractos de hígados analizados para el diseño de una herramienta de diagnóstico por ELISA provenían de muestras de 88 animales, recibidas en nuestro laboratorio desde distintas granjas de España durante brotes de la enfermedad hemorrágica ocurridos entre los años 2011 y 2013. Las muestras se clasificaron en 5 grupos mediante análisis por RT-PCR y secuenciación, atendiendo a regiones de la VP1 y de la polimerasa viral (Dalton *et al.*, 2018a; Dalton *et al.*, 2014). Los grupos que se generaron fueron: Grupo 1 (no infectados), que incluye extractos de hígados procedentes de 17 animales de granjas que no registraron brotes de la enfermedad; Grupo 2 (RHDV-G1) incluyendo 11 extractos de hígado de conejos infectados con diferentes aislados pertenecientes al genogrupo 1 de RHDV (incluyendo a la cepa de referencia RHDV-Ast89); Grupo 3 (RHDVa) que incluye extractos de hígado de conejos infectados por RHDVa; Grupo 4 (RHDVb) con extractos procedentes de hígado de 40 conejos infectados por RHDVb; y el Grupo 5 (RHDVbrec) que incluyó 12 extractos de conejos infectados por virus recombinantes (G1/RHDVb y np/RHDVb) con secuencias no estructurales pertenecientes a RHDV-G1 o a virus no patogénicos (Lopes *et al.*, 2015b).

Los extractos de hígado para analizar mediante ELISA se obtuvieron a partir de 30 mg de tejido hepático homogeneizado al 10 % en PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 8,1 mM Na₂HPO₄ anhidro, pH 7,5). Las muestras se clarificaron por centrifugación a baja velocidad (750 g) y se conservaron a -80 °C hasta su utilización.

3.1.4. Células procariotas

Las bacterias competentes utilizadas para la transformación y propagación de vectores de ADN plasmídico con distintas construcciones fueron distintas cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*), cuyos genotipos se muestran a continuación:

- Cepa XL-1-blue: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacI^q* Δ M15 Tn10 (Tet^r)].

- Cepa DH5 α : F⁻ ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r_k⁻, m_k⁺) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1* λ .

Por otro lado, la cepa utilizada para la expresión, inducción y posterior purificación de distintas construcciones fue de *E. coli* BL21 (DE3) cuyo genotipo es: F⁻ *ompT hsdS_B* (r_B⁻ m_B⁻) *gal dcm* (DE3).

Las bacterias lácticas empleadas en este trabajo para la generación de lactobacilos recombinantes pertenecen a la especie *Lactobacillus paracasei* (*L. paracasei*) (previamente conocida como *L. casei* o *L. zae* ATCC[®] 393 pLZ15⁻), actualmente nombrada también como BL23, y suministrada por ATCC[®] (*American Type Culture Collection*, Virginia, EE.UU.)

Las distintas cepas de *E. coli* fueron suministradas por *InvitrogenTM* (Massachusetts, EE.UU.), salvo en el caso de la cepa XL-1-blue, facilitada por la casa comercial *Agilent Technologies* (Santa Clara, EE.UU.).

3.1.5. Células eucariotas

Las células utilizadas para la generación y propagación de baculovirus recombinantes, así como para la producción de las proteínas VP1 correspondientes, pertenecen a dos líneas celulares de insecto disponibles en nuestro laboratorio: High-Five (HF) o BTI-Tn-5B1-4 (ATCC[®]CRL-10859) derivada de larvas de *Trichoplusia ni*, y Sf9 (ATCC[®] CRL-1711TM) procedente de ovario de *Spodoptera frugiperda*. Las células de insecto empleadas en este trabajo fueron suministradas por ATCC[®].

3.1.6. Vectores plasmídicos

El plásmido pTriEx-VP1-N11 previamente generado en nuestro laboratorio (comunicación personal de KP Dalton) incluye la secuencia de VP1 de RHDV-Nav10/11 bajo el control de tres promotores diferentes: pT7 (promotor de T7), pCMV (promotor de citomegalovirus), y el promotor de la polihedrina, para la expresión en bacterias, en líneas celulares de mamíferos y mediante baculovirus recombinantes, respectivamente. Este plásmido se transformó en *E. coli* (XL1) para su propagación y purificación y, posteriormente, sirvió como molde para hacer las distintas PCR y poder clonar los fragmentos solapantes de VP1 de RHDV-Nav10/11.

El vector plasmídico pUK21 en *E. coli* confiere resistencia a kanamicina, permite la selección de colonias blancas/azules gracias a que contiene el operón lac, derivado de un plásmido pUC (Vieira y Messing, 1991). En el presente trabajo pUK21 fue utilizado por

el laboratorio de IPLA para hacer una primera clonación de los dominios P amplificados por PCR y que, posteriormente, se subclonaron a un vector derivado de pEM76 (Martín *et al.*, 2000) y que contiene los genes necesarios para la integración de las construcciones deseadas en el genoma de *Lactobacillus*.

Para la clonación de fragmentos solapantes de la proteína VP1 de RHDV-Nav10/11 se empleó el plásmido pGex-2T donde se introdujeron en el sitio de clonación (MCS o *multiple cloning site*) los fragmentos de PCR obtenidos y posteriormente digeridos con las enzimas correspondientes. Contiene la secuencia que codifica la proteína GST. Incluye el sitio de reconocimiento de corte por trombina y confiere resistencia a ampicilina, además su promotor tac es inducible químicamente por IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido).

Para la clonación del dominio P de RHDV-Nav10/11 optimizado para su expresión en bacterias, fusionado con la proteína GST, se empleó el plásmido pGEX-4T-1, que incluye el sitio de corte por trombina y confiere resistencia a ampicilina. La expresión también es inducible por IPTG.

Los plásmidos derivados de pMal-c2x contienen por separado las secuencias optimizadas para su expresión en *E. coli* de los dominios P de RHDV-Nav10/11 y RHDV-Ast89 (pMalc2X-PdomN11opt y pMalc2X-PdomAst89opt, respectivamente). Estos vectores recombinantes fueron cedidos por el laboratorio del Dr. Grant S. Hansman (Departamento de Enfermedades infecciosas, Virología, Universidad de Heidelberg, Alemania). La secuencia optimizada de estos dominios P se obtuvo mediante el software online GeneArt® Gene Synthesis (Thermo Fisher Scientific™, Massachusetts, EE.UU.). Ambos plásmidos se utilizaron para la expresión y purificación de dichos dominios, pero el que contenía la secuencia de RHDV-Nav10/11, además, se empleó como molde para realizar los mutantes tanto puntuales como de secuencias de lazos.

3.1.7. Péptidos sintéticos

Los péptidos sintéticos utilizados en el ELISA de competición con 2D9 contenían las secuencias de los cinco lazos más externos del subdominio P2 de RHDV-Nav10/11 (**Tabla 3**) y fueron sintetizados por la empresa Abyntek Biopharma® S.L. (Vizcaya, España). Esta empresa se encargó también de la conjugación del péptido NL15 con la proteína KLH (Keyhole limpet hemocyanin) para el ensayo de inmunización en conejos.

El péptido VP60N, basado en la secuencia del lazo 1 de RHDV-Nav10/11 (His297-Ser310) (**Tabla 3**), fue sintetizado en la empresa Immunostep (Salamanca, España).

Tabla 3. Características de los péptidos sintéticos utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia de aminoácidos	Tamaño (aminoácidos)
NL15	NASYPGSSSNVLEL	15
SA34	SAGSAADNPISQIAPDGFDPMSFVFPFSGTTVPTA	34
WA15	WNSSNGAPFVTTVQA	15
TQ8	TGAPSNPQ	8
IA13	IYGVATGINQATA	13
VP60N	CHDRGNASYPGSSSS	15

3.1.8. Fragmentos de ADN sintético

Los fragmentos de ADN sintético que contienen una región de la secuencia del dominio P de RHDV-Nav10/11 con mutaciones puntuales (N387A, N387D y AT414-415), fueron suministradas por IDT (*Integrated DNA Technologies*, Iowa, EE.UU.). Los fragmentos correspondían a la secuencia que se encuentra entre los sitios de restricción de Pst I (posición 111) y Not I (después del codón de parada) en el dominio P de RHDV-Nav10/11 optimizado para su expresión en bacterias. Para obtener mayor cantidad de estos ADN, fue necesaria la amplificación de los fragmentos sintéticos por PCR con la polimerasa *LA Taq* y los cebadores Pst-PdomFwd (5'-CGCGCAATTGTTGGTCTGCA GCC-3') y Not-PdomRev (5'-TATATGCATGCCCGCGGGCGGCC-3').

3.1.9. Anticuerpos

El anticuerpo policlonal Anti-VP60N fue producido por la empresa Immunostep. Los sueros suministrados consistieron en un suero preinmune (entre 5-10 mL), dos sueros procedentes de muestras intermedias (entre 5-10 mL) en el proceso de inmunización y un suero final. Este suero final se empleó en Dot blot como control positivo y específico puesto que reacciona frente al lazo 1 del dominio P de RHDV-Nav10/11, pero no frente al de RHDV-Ast89.

El suero policlonal anti-RHDV (Virlab) había sido producido previamente, en nuestro laboratorio, en un conejo que sobrevivió a la infección por RHDV-Ast89. El suero hiperinmune final se comprobó que reacciona frente a distintas zonas de la proteína de VP1 de distintos aislados de RHDV tanto clásico como de la nueva variante.

Los anticuerpos comerciales conjugados con peroxidasa de rábano (HRPO) empleados en este trabajo para la detección de inmunoglobulina G (Ig G) de conejo, ratón o cabra por ELISA fueron suministrados por *Sigma-Aldrich* (Darmstadt, Alemania). El anticuerpo secundario empleado en la citometría de flujo para detectar IgGs de conejo, *Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG H&L*, fue suministrado por la casa comercial *Abcam* (Cambridge, Reino Unido).

El resto de los anticuerpos primarios monoclonales empleados se produjeron para este trabajo siguiendo un protocolo establecido especificado en el apartado 3.10.4.

El anticuerpo policlonal de cabra empleado en el desarrollo de un ELISA de detección de RHDVb, fue generado por la Dra. Rosa Casais (SERIDA, Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario), mediante la inmunización con VLPs de RHDV-Nav10/11 purificadas. El protocolo de inmunización consistió en 5 inyecciones intramusculares a 1, 7, 14 y 21 días usando 500 µg de VLPs purificadas emulsionadas con adyuvante incompleto de Freud, la última inyección a los 28 días se realizó con 1 mg de VLPs por vía intravenosa. El suero obtenido al día 35 se utilizó como anticuerpo policlonal anti-RHDV-Nav10/11.

3.2. MÉTODOS DE CULTIVOS CELULARES

3.2.1. Cultivo de células eucariotas

Las células de insecto Sf9 y HF se cultivaron en medio *Insect-Xpress* suplementado con 5 % de suero fetal bovino (SFB) inactivado, 0,5 % de penicilina/estreptomicina y esterilizado por filtración con membranas de 0,22 µm *Millipore Express™ PLUS*. Los cultivos en suspensión (Sf9) y en monocapa (Sf9 o HF) se incubaron a 28°C.

El medio *Insect-Xpress* fue suministrado por *Lonza* (Basilea, Suiza), y el suero fetal bovino y la mezcla de antibióticos penicilina/estreptomicina por *Gibco (Thermo Fisher Scientific™)*. Las membranas de filtración utilizadas en este trabajo son de la casa comercial *Merk, Millipore* (Darmstadt, Alemania).

3.2.2. Cultivo de células bacterianas

Las bacterias *E. coli* se cultivaron en medio líquido Luria-Bertani (LB) (triptona 20 g/L, extracto de levadura 10 g/L, cloruro de sodio 10 g/L, pH 7,5). Para la preparación de medio sólido se añadió agar (15 g/L). Cuando fue necesario la selección de colonias por

color se añadió isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG, 0,1M) y 5-bromo-4-clor-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-gal, 20 mg/mL). Los reactivos IPTG y X-gal fueron suministrados por *Promega* (Wisconsin, EE.UU.).

El medio fue suplementado con ampicilina a 100 μ g/mL para la selección de los plásmidos de interés que contienen el gen de resistencia a ampicilina. Los cultivos se incubaron a 37°C, y en agitación de 250 rpm en el caso de cultivos en caldo LB.

Las bacterias lácticas (*Lactobacillus paracasei*) se cultivaron en medio De Man, Rogosa y Sharpe (MRS) (*Merk*), bien en caldo o en placas con agar. El medio se suplementó con eritromicina en 2,5 μ g/mL cuando fue necesaria la selección de lactobacilos transformantes. Los cultivos se incubaron a 37°C sin agitación.

Todos los antibióticos empleados para la selección de bacterias transformantes fueron suministrados por *Sigma-Aldrich*.

3.2.3. Transfección de células de insecto y producción de baculovirus recombinantes (rBVs)

Para la producción de baculovirus recombinantes en células de insecto se utiliza un báculo que contiene el genoma del baculovirus knockout ORF1629 (BAC10:KO₁₆₂₉) (Zhao *et al.*, 2003). La cepa de *E. coli* transformada con el báculo se cultiva en 100 mL de medio LB con cloranfenicol (25 μ g/mL) y kanamicina (25 μ g/mL). El báculo se purificó con el sistema *Qiagen Maxi Kit* siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN del báculo se linealizó con el enzima de restricción Eco 81I (5U/0,5 μ g ADN) (*Thermo Fisher Scientific*TM) durante 3 horas a 37 °C y después se inactivó el enzima calentando a 80 °C durante 20 minutos.

Los vectores de transferencia que se utilizaron en la producción de VLPs en cultivos celulares habían sido previamente desarrollados por nuestro grupo. Los vectores pTri-Ex contenían por separado las secuencias de VP1 de distintos RHDV (RHDV-Nav10/11, RHDV-Ast89 y RHDV-Gal09/12). Se emplearon en la transfección de cultivos celulares de células de insecto para la generación de baculovirus recombinantes que expresaran las distintas VP1 mencionadas previamente.

La introducción de ADN en células eucariotas se realizó en monocapas celulares de insecto con aproximadamente 1×10^6 células/pocillo en placa de 6 pocillos. Las mezclas

de transfección se prepararon con 0,5 µg de bácmido linearizado, 0,5 µg de vector de transferencia y 8 µL del reactivo de transfección *Cellfectin® II* (Invitrogen™). Una vez incubadas durante 20 minutos a temperatura ambiente, se mezclaron con 1 mL de medio de cultivo sin suero. Tras lavar las monocapas celulares con medio sin suero, se les añadió las mezclas de transfección y se incubó a 28 °C durante al menos 4 horas. Después se retiraron las mezclas de transfección y se añadió medio de cultivo con suero y antibióticos y se dejaron a 28 °C durante 2-5 días, dependiendo de la confluencia de las monocapas. El sobrenadante recuperado donde se encuentra el baculovirus recombinante se utilizó para infectar con 100-200 µL un frasco de mayor tamaño (T150) con células Sf9 al 50 % de confluencia y, que se incubará a 28 °C durante 5-7 días para conseguir mayor número de viriones (amplificación del virus).

Para titular los stocks de baculovirus recombinantes, se utilizaron monocapas de células Sf9 sembradas en placas de 6 pocillos, con $1,5 \times 10^6$ células/pocillo en un volumen total de 2 mL. Una vez que las células se adhieren a las placas, se preparan diluciones seriadas del stock de baculovirus recombinantes, de las que se añadieron 100 µL por pocillo una vez retirado el medio con cuidado, y se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente. Seguidamente, se preparó una solución de agarosa (*Sigma-Aldrich*) al 3 % que una vez esterilizada en el autoclave, se mezcló en proporción 1:1 con medio. Se retiró el inóculo de baculovirus y se añadieron 2 mL de agarosa al 1,5 % por pocillo. A los 15 minutos, ya solidificada la agarosa, se puso 1 mL de medio por pocillo, y se incubó a 28 °C. Pasados 4 días, se retiró el medio sobre la agarosa y se tiñeron las células con 1 mL/pocillo de solución Rojo Neutro (0,6 mL de rojo neutro en 10 mL de PBS). Después de incubar a 28°C durante 2-4 horas, se quitó el sobrenadante, se invirtieron las placas y se dejaron toda la noche en oscuridad a temperatura ambiente. Al día siguiente se contaron las placas de lisis para obtener el número de ufp/mL de los stocks de baculovirus, según la siguiente fórmula:
$$N^{\circ} \frac{ufp}{mL} = \frac{\text{placas de lisis}}{\text{dilución } (10^{-n}) \times \text{volumen inicial stock (mL)}}$$
; donde el volumen inicial del stock es la cantidad en mL que se cogió de la solución de baculovirus para comenzar las diluciones seriadas.

3.2.4. Transformación de células *E. coli*

Las células *E. coli* quimiocompetentes se descongelaron en hielo, se transformaron 50 µL de células con una cantidad de vector plasmídico entre 10 y 50 ng en un volumen de 5 µL. Se incubó la mezcla durante 30 minutos en hielo, después se pusieron en un baño

térmico a 42 °C durante 30 segundos y se incubaron de nuevo en hielo durante 2 minutos. Seguidamente se añadieron 500 µL de medio LB o medio SOC fresco sin antibióticos y las mezclas se incubaron a 37 °C durante 1 hora en agitación a 250 rpm. Finalizada la incubación, Una vez pasado, las bacterias transformadas se extendieron con ayuda de un asa de Digralski estéril en medio sólido LB con ampicilina. Las placas de LB sembradas se incubaron durante unas 24 horas a 37 °C, y las colonias aisladas de bacterias transformadas se re-sembraron en caldo LB con ampicilina.

Los precultivos se realizaron en tubos con 5 mL de caldo LB con ampicilina, a 37°C durante 16-18 horas y con agitación de 250 rpm. En algunos casos estos precultivos se usaron para extraer y purificar el ADN plasmídico y comprobar las secuencias clonadas. Por otro lado, cuando se usaron para escalar a cultivos de mayor volumen, se inocularon matraces Erlenmeyer, con 100 o 500 mL de caldo LB, con 1 o 5 mL del precultivo, respectivamente (dilución 1:100) y se mantuvieron a 37 °C en agitación (250 rpm) durante 3-4 horas hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de entre 0,4-0,6.

3.3. MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

3.3.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de secuencias de ADN se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa, utilizando los reactivos suministrados en el kit *LA Taq* y siguiendo las recomendaciones del fabricante en un termociclador *Mastercycler Personal* (*Eppendorf*, Hamburgo, Alemania). Las condiciones de temperatura, tiempo y repeticiones de cada ciclo se establecieron en función de las temperaturas de fusión de los oligonucleótidos (T_m) y de la longitud del fragmento a amplificar. De forma general, las condiciones de amplificación tuvieron un paso inicial de desnaturalización a 94 °C durante 5 minutos y entre 20-30 ciclos que incluían una desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, un paso de hibridación de cebadores a 54-62 °C durante 30 segundos, un paso de extensión a 68-72 °C de 30 segundos/kb, y una extensión final de 5 minutos.

Para la fusión de fragmentos de ADN solapantes se realizó una reacción de PCR normal en la que se incluían los fragmentos a empalmar con la mezcla de reacción, pero en ausencia de cebadores. Las condiciones de amplificación en este caso fue una desnaturalización inicial de 5 minutos a 94 °C, 15 ciclos de desnaturalización (94 °C, 1

minuto), hibridación (65 °C, 1 minuto) y extensión (72 °C, 1 minuto) y con una extensión final de 5 minutos a 72 °C.

Todos los cebadores diseñados y utilizados en este trabajo fueron suministrados por la casa comercial *Sigma-Aldrich*. El kit de PCR que contiene la enzima *LA-Taq* fue suministrada por *Takara* (Shiga, Japón).

3.3.2. Extracción de ARN a partir de hígado de conejo

Para analizar la presencia de copias de ARN viral en las muestras de hígado tomadas de conejos infectados con el virus, fue necesario realizar la extracción del ARN total usando el sistema comercial *GenElute Total Mammalian RNA mini* siguiendo las instrucciones del fabricante (*Sigma-Aldrich*). Para esto, se tomó un trozo de hígado de aproximadamente 10 mg, y se disgregó con ayuda de un bisturí estéril, luego una vez dentro de un eppendorf se añadió PBS estéril y se continuó disgregando el tejido con ayuda de una punta de pipeta. Se tomaron 100 µL de este homogeneizado de hígado y se mezclaron con el tampón de lisis del kit comercial para comenzar la extracción del ARN.

3.3.3. RT-qPCR para cuantificación de copias de ARN viral de RHDV

Para comprobar la presencia y cuantificar las copias de ARN viral en muestras de hígado de conejos infectados por el virus, se utilizó la técnica de RT-qPCR (transcripción inversa-PCR cuantitativa), según (Dalton *et al.*, 2018a). Para cada ensayo de cuantificación, se realizó una recta patrón con muestras que contenían un número conocido de copias de ARN viral. La RT-qPCR se realizó en la unidad de secuenciación de ADN de los Servicios Científico-Técnicos (SCTs) de la Universidad de Oviedo empleando el sistema *7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, California, EE.UU.)*. El análisis posterior de los datos se llevó a cabo utilizando el software *Sequence Detection systems 7900HT Version SDS 2.3, OS Version (Applied Biosystems)*.

3.3.4. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa o productos de PCR

Para la recuperación de un fragmento determinado de ADN se realizó en primer lugar la separación electroforética de la muestra y, posteriormente, se recortó con una hoja de bisturí estéril la banda deseada observada con ayuda de un transiluminador de UV. La

extracción y purificación del ADN a partir del trozo de agarosa, se realizó con el sistema *Wizard SV Gel and PCR Clean-up System* siguiendo las instrucciones del fabricante (*Promega*). El mismo kit, y siguiendo sus recomendaciones, se utilizó para limpiar fragmentos de ADN de sales, nucleótidos o enzimas presentes en mezclas de reacción, como digestiones con enzimas de restricción o reacciones de PCR.

3.3.5. Purificación de ADN plasmídico a partir de cultivos bacterianos

La purificación de plásmidos a partir de cultivos bacterianos se realizó a distintas escalas dependiendo de las necesidades de cantidad de ADN plasmídico. La purificación a pequeña escala se realizó partiendo de entre 2 y 4 mL de cultivo bacteriano empleando el sistema *GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit*, siguiendo las instrucciones del fabricante. A mayor escala los volúmenes de partida se encontraban entre 50 y 100 mL de cultivo, empleando el sistema *GenElute™ Plasmid Maxiprep Kit* y siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los kits de purificación de ADN plasmídico fueron suministrados por la casa comercial *Sigma-Aldrich*.

3.3.6. Cuantificación de ADN

La estimación de la concentración de ADN se realizó mediante la comparación visual de la intensidad de bandas de la muestra de interés y del patrón de peso molecular tras una electroforesis en gel de agarosa. Para una determinación más cuantitativa se midió la absorbancia a 260 nm de determinadas diluciones de la muestra en cubetas de plástico usando un *Biophotometer (Eppendorf)*.

3.3.7. Secuenciación de ADN

La secuenciación de segmentos de ADN se realizó en la unidad de secuenciación de ADN de los Servicios Científico-Técnicos (SCTs) de la Universidad de Oviedo utilizando un aparato de secuenciación capilar *ABI Prism 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems)*.

3.4. ELECTROFORESIS EN GELES

3.4.1. Electroforesis de ADN

La separación de fragmentos de ADN de diferentes tamaños, procedentes de reacciones de PCR o restricción con enzimas, se efectuó mediante electroforesis en geles

de agarosa al 1 % en tampón TAE (40 mM Tris-acetato, 2 mM EDTA, pH 8). Las muestras se mezclaron con tampón de carga *6X Orange DNA Loading Dye* en dilución 1:5 (v/v) antes de cargarlas en los pocillos del gel. Para la tinción del ácido nucleico se añadió el colorante fluorescente *RedSafe™* a la mezcla de agarosa fundida, y así poder observar luego el ADN con ayuda de un transiluminador. La estimación del tamaño de las bandas de ADN se realizó por comparación con las bandas del marcador de peso molecular empleado (*O'Generuler 1 Kb Plus DNA Ladder*).

El tampón de carga y el marcador de peso molecular empleados fueron suministrados por *Thermo Fisher Scientific™*. Mientras que el colorante *RedSafe™* es de la casa comercial *Intron Biotechnology*, Gyeonggi, Corea del Sur.

3.4.2. Electroforesis de proteínas

Para análisis de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), las muestras se mezclaron con tampón de disociación de proteínas (125 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2 % (p/v) SDS (dodecil sulfato sódico), 0,62 % β - mercaptoetanol, 8,75 % glicerol y 0,01 % (p/v) azul bromofenol), se calentaron durante 10 minutos a 90 °C y se centrifugaron con un pulso de unos 10 segundos. El procedimiento de electroforesis se realizó según lo describió Laemmli, (1970), con geles de empaquetamiento y separación al 3,5 % y 10 % de poliacrilamida, respectivamente, empleando en la preparación los tampones de electroforesis a pH 6,8 (0,5 M Tris-Cl y 0,4 % SDS) y a pH 8,8 (1,5 M Tris-Cl y 0,4 % SDS). Una vez montado el sistema *Mini Protean III (Bio-rad, California, EE.UU.)* y, en presencia del tampón de corrido de electroforesis (24,8 mM Tris, 192 mM glicina y 1 % SDS), se aplicó una intensidad de corriente de 150 mA durante 1 hora aproximadamente. Cuando fue necesario hacer una electroforesis en condiciones nativas, el procedimiento utilizado fue el mismo, pero el tratamiento de las muestras se realizó en tampón de disociación sin SDS ni β -mercaptoetanol.

Después de la electroforesis, los geles pudieron tener diferentes tratamientos. En algunos casos se destinaron a la detección específica de proteínas mediante Western blot para lo que se sometieron a la transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa. En otros casos, se utilizaron para mostrar la presencia y tamaño de proteínas, y/o a la estimación de la concentración de una determinada proteína en la muestra, para lo que se tiñeron con la solución Coomassie Blue (45 % metanol, 10 % ácido acético, 0,25 % azul

brillante). Posteriormente, se destiñeron con una solución al 7,5 % ácido acético y 10 % metanol, y se analizaron con ayuda del aparato *Odyssey Infrared Imaging System* (LI-COR Biosciences, Nebraska, EE.UU.) y el software (*Image Studio*, LI-COR Inc., Nebraska, EE.UU.). El tamaño molecular de las proteínas se estimó con ayuda del marcador preteñido (*Page Ruler Prestained NIR protein Ladder*), mientras que la concentración se estimó comparando intensidades de las bandas de proteínas con las del marcador molecular (*LMW*).

El marcador molecular preteñido y el marcador molecular *LMW* fueron suministrados por los fabricantes *Thermo Scientific*[™] y *GE Healthcare Life Science* (Munich, Alemania), respectivamente.

3.5. GENERACIÓN DE LACTOBACILOS RECOMBINANTES

La generación de lactobacilos recombinantes que expresan en distintas formas los dominios P de RHDV-Nav10/11 o RHDV-Ast89 se llevó a cabo con supervisión de la Dr. M^a Cruz Martín (Instituto de Productos Lácteos de Asturias, IPLA).

Mediante PCR a partir de las secuencias de los dominios P optimizados incluidas en los plásmidos pMalc2X-DomPN11opt y pMalc2X-DomPAst89opt se incluyeron los sitios de restricción NcoI y XbaI necesarios para realizar el subclonaje de los dominios. Para ello se diseñaron los cebadores correspondientes mostrados en la **Tabla 4**. En el caso del extremo 5' de ambos tipos de dominios P (Ast89 o Nav10/11) se diseñaron 2 cebadores que hibridaban en sitios distintos del plásmido pMalc2X donador, de forma que incluían (P-DomHisTNco) o no (P-DomNco) la secuencia de cola de histidinas en la nueva construcción (**Tabla 4**). Por otro lado, para el extremo 3' cuya secuencia es diferente en ambos dominios P, se diseñaron dos tipos de cebadores para cada uno: uno de ellos sin codón de terminación para poder generar dominios P anclados a la pared bacteriana (P-DomASTXbans y P-DomN11Xbans) y el otro que sí incluye un codón de terminación para poder producir los dominios P secretables (P-DomASTXba y P-DomN11Xba).

Las amplificaciones de dominios P obtenidas con las secuencias deseadas añadidas se cortaron con los enzimas de restricción (NcoI y XbaI) al igual que el vector pUK21 en el que se iban a insertar los fragmentos amplificados. Se transformaron en *E. coli* los plásmidos obtenidos con las distintas construcciones de dominios P, por un lado, para la

expresión anclada a pared (sin codón de terminación): pIPLA1317 (Dominio P Ast89 con cola histidinas), pIPLA1318 (Dominio P Ast89), y pIPLA1320 (Dominio P Nav10/11); por otro lado, para la secreción de los dominios (con codón de terminación incluido): pIPLA1336 (Dominio P Ast89) y pIPLA1337 (Dominio P Nav10/11). Todas las secuencias se comprobaron mediante secuenciación.

Tabla 4. Oligonucleótidos empleados en la clonación de dominios P de RHDV para la generación de los plásmidos integrativos.

Nombre	Secuencia (5'-3')*	Longitud (nt)	Polaridad
P-DomHisTNco	ACCCGCAGTTCGAAACCATGGGCCACCACCACC	33	+
P-DomNco	GTTCCAGGGGCCCATGGCCAGCAAAACCGTTG	32	+
P-DomASTXbans	GCTCTAGACAGATTAAAAACCAGGGTGC	28	-
P-DomN11Xbans	GCTCTAGACAGATTATAAACCAGGGTGC	28	-
P-DomASTXba	GCTCTAGAtcaCAGATTAAAAACCAGGGTGC	31	-
P-DomN11Xba	GCTCTAGAtcaCAGATTATAAACCAGGGTGC	31	-

*Los nucleótidos subrayados indican los sitios de restricción generados. Las minúsculas muestran los nucleótidos añadidos para generar los codones de parada.

El siguiente paso fue añadir a las secuencias de los dominios P las partes necesarias del gen *apf* para su expresión en forma secretada o anclada a la pared. Para ello se clonaron en una región intermedia entre las que codifican la región de la señal de secreción y la región de anclaje a la pared del gen *apf*. Esta clonación se hizo utilizando los sitios de restricción NcoI y XbaI del gen *apf* que se encontraban al final de la señal de secreción y principio de la región de anclaje, respectivamente. Los vectores que contenían las regiones del gen *apf* fueron generados en anteriores trabajos por el IPLA, siendo derivados del plásmido pEM76. Estos mismos vectores también incluían los genes de integración necesarios para introducir las secuencias deseadas en el genoma de *Lactobacillus*, y las secuencias *six* para la resolución del ADN que permite eliminar el ADN no deseado.

A continuación, la cepa silvestre de *Lactobacilos paracasei* (BL23) se transformó mediante electroporación separadamente con cada uno de los plásmidos generados en *E. coli*, que incluían las secuencias de dominios P de RHDV, para su expresión anclados a la pared: pIPLA1322 (Dominio P Ast89 con cola de histidinas), pIPLA1324 (Dominio P Ast89) y pIPLA1328 (Dominio P Nav10/11); o secretados: pIPLA 1339 (Dominio P Ast89) y pIPLA1340 (Dominio P Nav10/11).

Finalmente, se siguió el mecanismo de integración de secuencias en el cromosoma de *Lactobacilos* descrito en Martín *et al.*, 2011. Comprobando mediante PCR cada uno de los pasos, tanto de integración como de depuración y curación.

3.6. GENERACIÓN Y/O PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN Y DOMINIOS P DE RHDV

3.6.1. Clonación de fragmentos solapantes de VP1 de RHDV-Nav10/11 fusionados a la proteína GST

La clonación de los dominios de VP1 por separado en forma de fusión con GST, se basaron en la secuencia de VP1 de RHDV-Nav10/11 del plásmido pTriEx-VP1-Nav10/11. Utilizando como molde dicho plásmido se realizaron PCR con los cebadores (**Tabla 5**) que incluían los sitios de restricción deseados para la clonación de los fragmentos solapantes en el vector pGex-2T.

Los fragmentos solapantes que incluyen cada uno de los dominios de VP1, se cortaron con los enzimas de restricción correspondientes a los sitios introducidos en el paso previo: el dominio N con BamHI y EcoRI, el dominio S+región bisagra con Eco 31I (BsaI) y EcoRI, y tanto el subdominio P2+región bisagra como el subdominio P1 con BamHI y EcoRI. El vector pGex2T también se digirió con los enzimas correspondientes al fragmento a clonar y, posteriormente, se realizó la ligación con la ADN ligasa del bacteriófago T4. Las mezclas de ligación se transformaron en células XL-1-blue, siguiendo las instrucciones de la casa comercial. A partir de los clones transformados obtenidos se amplificaron los plásmidos y purificaron para comprobar la correcta inserción de las secuencias tanto por digestión con los enzimas de restricción como por secuenciación con los oligonucleótidos pGex5' (5'-GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3') y pGex3' (5'-CCGGGAGCTGCATGTGTCAA GG-3').

Para la obtención de extractos de células que expresan las distintas fusiones de fragmentos de VP1, en primer lugar, los plásmidos producidos se transformaron en células BL21 (DE3). Posteriormente, se prepararon preinóculos de 5 mL a partir de los cuáles se inocularon 1/10 matraces con 100 mL de caldo LB con ampicilina que, una vez alcanzaron una densidad celular de 0,4 (DO 600nm), se indujeron con una concentración final de 200 µM de IPTG y se incubaron a 37°C en agitación durante 1 hora. Tras la inducción se recogieron los cultivos centrifugando a 4500 rpm (3900 g) durante 30 minutos y se lavó el pellet de células con PBS. Para la rotura celular se resuspendieron

las células en PBS y se trataron con ultrasonidos (*Digital Sonifier®*, Branson, Connecticut, EE.UU.) a una amplitud de 50 % durante 2 periodos de 2 minutos cada uno con pulsos de 20 segundos y descansos de 30 segundos, manteniendo siempre la muestra en hielo. El extracto celular resultante se analizó mediante electroforesis (SDS-PAGE) y se comprobó la presencia de las proteínas de fusión. Estos extractos se utilizaron directamente para la caracterización antigénica de la proteína VP1.

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados en la clonación de fragmentos solapantes de la proteína VP1 de RHDV-Nav10/11.

Nombre	Secuencia (5'-3')*	Longitud (nt)	Polaridad
Fwd-DomN/BamHI	GCATGCATGCGGATCCATGGAGGGCAAAGCCCCGCGCGG	38	+
Rev-DomN/EcoRI	ACAGTGTACAGAATTCCTGCCCGGGCGTCTGCAACTGA	38	-
Fwd-DomS+H/BsaI	GTCGATTGCAGGTCTCGGATCCGGCGGTCCACCCCAACA AGTGG	44	+
Rev-DomS+H/EcoRI	CGTTCCAGTGGAAATTCGCACGTAGAAAACCCACCGGGG	38	-
Fwd-DomP2+H/BamHI	GCCATTTGGTGGATCCACGAGCGCGATC	28	+
Rev-DomP2+H/EcoRI	ATGATGGGTGAATTCCTGCCAATAGGAGCGGCAG	34	-
Fwd-DomP1/BamHI	GGGTTGTTTGGATCCGCATCGGGTGTTCATATCCACCC	37	+
Rev-DomP1/EcoRI	GCATGCATGCGAATTCCTCAGACATAAGAAAAGCCATTG	38	-

*Los nucleótidos subrayados indican los sitios de restricción generados para la clonación.

Todas las enzimas de restricción empleadas fueron suministradas por *Thermo Scientific™* en formato *Fast Digest*.

3.6.2. Dominios P de RHDV-Nav10/11 fusionados a GST

La construcción de la fusión de dominios P con la proteína GST se basó en la secuencia del dominio P RHDV-Nav10/11 optimizado para su expresión en bacterias que se encuentra en el plásmido pMalc2X-PdomN11opt. En primer lugar, se procedió a la subclonación del dominio al vector pGex4T1 cuyo sitio de clonación permite fusionar la proteína de interés con la proteína GST (glutathione S-transferase). Para ello se realizó la digestión enzimática de los plásmidos mencionados con los enzimas BamHI y NotI siguiendo las instrucciones indicadas por los fabricantes. Con la mezcla de la digestión de pMalc2X-PdomN11opt se realizó una electroforesis, se recortó la banda correspondiente al dominio P de RHDV-Nav10/11 de 1030 pb de tamaño y se purificó el ADN a partir del bloque de agarosa. El mismo método se siguió con la digestión de pGex4T1, pero la banda de ADN purificada fue la correspondiente al plásmido linealizado de unas 4939 pb. Para la ligación del vector y el inserto se empleó el sistema comercial del enzima ADN ligasa del bacteriófago T4 siguiendo las instrucciones del fabricante. La mezcla de ligación se transformó en la cepa XL1 de *E. coli*, y se seleccionó

alguno de los clones obtenidos para amplificar el plásmido, purificarlo y comprobar la secuencia del dominio P por secuenciación con los cebadores pGex5' y pGex3'.

Para la inducción y purificación de la proteína de fusión del dominio P con GST, el plásmido obtenido pGex4T1+PdomN11opt se transformó en la cepa BL21 de *E. coli*. Un precultivo de BL21 conteniendo el plásmido se cultivó durante toda la noche a 37 °C en agitación de 250 rpm. Un matraz Erlenmeyer con 50 mL de caldo LB con ampicilina se inoculó con una proporción 1:10 del precultivo preparado previamente y se dejó incubar hasta alcanzar una densidad óptica celular a 600 nm de aproximadamente 0,6. El cultivo se enfrió a 20 °C durante 1 hora en agitación a 250 rpm, y se inició la inducción añadiendo IPTG a una concentración final de 200 µM. Se dejó induciendo a 20 °C toda la noche (unas 18 horas) en agitación a 160 rpm. Al día siguiente, el cultivo se centrifugó a 4500 rpm (3900 g) durante 40 minutos para recoger las células y el pellet se lavó una vez con PBS pH7,5. Para romper las células se resuspendieron en PBS pH7,5 con 0,1 % de Tritón X-100 y se rompieron con ayuda de un aparato de ultrasonidos (*Digital Sonifier®*, *Branson*) a una amplitud de 50 % durante 2 periodos de 2 minutos cada uno con pulsos de 20 segundos y descansos de 30 segundos, manteniendo siempre la muestra en hielo. Posteriormente, se centrifugó el extracto celular a 16000 rpm (24000 g) durante 30 minutos para separar la fracción soluble que contenía la proteína de fusión. El reactivo Tritón X-100 fue suministrado por la casa comercial *Scharlab* (Barcelona, España).

A partir de la fracción soluble obtenida se realizó la purificación de la proteína de fusión GST-P, para lo que se utilizó la matriz *Glutathione Sepharose®* y un procedimiento de purificación por gravedad. En una columna de plástico para purificación se depositaron 200 µL de la mezcla de matriz en etanol y se dejó sedimentar. Se hicieron 3 lavados de la matriz con 500 µL de agua destilada cada uno, después se equilibró haciendo pasar 3 veces 5 mL de PBS pH7,5. Una vez equilibrada se añadieron 5 mL de fracción soluble y se dejó interaccionar con la matriz durante 30 min en un agitador rotativo *Orbit* (*J.P. Selecta S.A.*, Barcelona, España) a temperatura ambiente. Se dejó sedimentar la matriz y se recogió el material no adsorbido, y se hicieron 3 lavados adicionales de 5 mL cada uno con PBS pH 7,5. Posteriormente, se hicieron 3 eluciones añadiendo 200 µL cada vez de una solución de glutatión reducido o GSH 10 mM. En todos los pasos se tomaron muestras para su análisis mediante electroforesis (SDS-PAGE). Las columnas de purificación, la matriz *Glutathione Sepharose* y el GSH

empleados fueron suministrados por *Thermo Scientific*TM, *GE Healthcare Life Science*, *Sigma-Aldrich*, respectivamente.

Cuando fue necesario cortar la proteína de fusión, estando todavía pegada a la matriz se le añadió 2 unidades de trombina disuelta en 200 μ L de PBS y se dejó actuar toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente se recogió la fase móvil de la columna y se hicieron 2 eluciones más de 100 μ L cada una con PBS. Las muestras de eluidos y la matriz cromatográfica se analizaron mediante electroforesis para comprobar que el dominio P había eluido de la columna mientras que la proteína GST había quedado unida a la matriz. La proteína trombina fue suministrada por *GE Healthcare*, *Sigma-Aldrich*.

3.6.3. Dominios P fusionados con MBP y cola His-tag

Los plásmidos pMalc2X-DomPN11opt y pMalc2X-DomPAst89opt que contienen las secuencias optimizadas de los dominios P de RHDV-Nav10/11 y RHDV-Ast89 se transformaron en la cepa BL21 de *E. coli*. El protocolo empleado para la inducción de la expresión y purificación de estos dominios P con cola de histidinas y MBP fue el desarrollado por Leuthold *et al.*, (2016) para los dominios P de Norovirus humano en el mismo sistema de expresión.

3.6.4. Clonación y producción de dominios P mutantes puntuales basados en aislados naturales de RHDVb

Se diseñaron fragmentos de ADN sintético del dominio P optimizado de RHDV-Nav10/11 que contienen varias mutaciones puntuales observadas en secuencias de aislados silvestres de RHDVb y RHDV-Ast89 (**Tabla 6**). Los tres fragmentos correspondientes a la misma región del dominio P estaban flanqueados por los sitios de restricción de Pst I y Not I. Por tanto, el primer paso para la clonación consistió en la digestión con las enzimas Pst I y Not I. El plásmido pMalc2X-DomPN11opt se digirió con los mismos enzimas y se ligaron los distintos fragmentos por separado, utilizando el enzima ligasa de ADN T4. Las mezclas de ligación se transformaron separadamente en *E. coli* XL1. Tras comprobar las secuencias de los dominios P mutantes con los cebadores pMalc2X-F y pMalc2X-R, se transformaron los distintos plásmidos construidos en la cepa BL21. La expresión de los dominios P mutantes (N387A, N3867D y AT414-15) fusionados con colas de histidinas y MBP, y su posterior purificación se realizó según el protocolo descrito en Leuthold *et al.*, 2016.

Los enzimas NotI, PstI y la ligasa fueron suministrados por la casa comercial *Thermo Scientific*[™].

Tabla 6. Características de los mutantes puntuales de dominios P de RHDVb.

Nombre del mutante	Posición de los residuos mutados*	Residuo original en RHDVb	Residuo presente en el mutante
N387A	387	Asparagina (Asn)	Alanina (Ala)
N387D	387	Asparagina (Asn)	Aspartato (Asp)
AT414-15	414 y 415	Alanina (Ala) y Treonina (Thr)	Asparagina (Asn) y Prolina (Pro)

*Posición del residuo mutado dentro de la secuencia de la proteína VP1.

3.6.5. Mutagénesis, clonación y producción de dominios P mutantes de lazo de VP1 de RHDV-Nav10/11

Los cambios en las secuencias de lazos del dominio P optimizado de RHDV-Nav10/11 por las secuencias de RHDV-Ast89 se realizaron mediante la técnica de unión de fragmentos solapantes mediante PCR. Las mutaciones se introdujeron mediante los cebadores mutagénicos (**Tabla 7**) y la amplificación de los fragmentos se realizó a la vez con esos mismos oligonucleótidos y con pMalc2X-F (5'-TCAGACTGTCGATGAAGC-3') o pMalc2X-R (5'-GATGTGCTGCAAGGCGAT-3') que flanquean la secuencia del dominio P. Una vez obtenidos los fragmentos solapantes se fusionaron mediante una PCR sin cebadores, y el fragmento resultante de dominio P que contenía las mutaciones en el lazo elegido se amplificó con los oligonucleótidos (pMalc2X-F y pMalc2X-R). Posteriormente, se procedió a la digestión con los enzimas de restricción BamHI y NotI, siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras la purificación de la secuencia de dominio P mutante digerido, se ligó en el plásmido pMalc2X previamente linealizado con los mismos enzimas de restricción (BamHI/NotI) y tratado con fosfatasa alcalina (*Fast AP*[™], *Thermo Scientific*[™]). Las mezclas de ligación obtenidas se transformaron en la cepa comercial de *E. coli* DH5 α . Para comprobar la presencia de las mutaciones deseadas en los lazos del dominio P, los clones seleccionados se secuenciaron con pMalc2X-F y pMalc2x-R.

En el caso de los mutantes del lazo 2 o lazo 3 se realizaron las mutagénesis de una forma más directa utilizando el sistema comercial de *QuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit* siguiendo las indicaciones del fabricante. Se emplearon dos parejas de cebadores mutagénicos para mutar el lazo 2 (L2-Ast89-F1/L2-Ast89-F2 y L2-Ast89-

L5-Ast89-R	GCCATAACAAACAGACCTGCGGgattCTGAgcAgT ACCGGTGaCAACAgCATAAATGCTTTTGGC	65	+
------------	---	----	---

*En minúscula se representan los nucleótidos que cambian con respecto a la secuencia de RHDV-Nav10/11.

3.7. PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE PARTÍCULAS SIMILARES AL VIRUS (VLPs)

Los baculovirus recombinantes que expresan las proteínas VP1 de distintas cepas de RHDV, se usaron para infectar cultivos de células de insecto ya fuesen monocapas de células HF o cultivos en suspensión de sf9. Los stocks virales se titularon previamente para comprobar que contenían cantidades adecuadas de viriones, como mínimo de 10^7 ufp/mL.

En el caso de la producción en células HF, monocapas celulares semiconfluentes en frascos de 150 cm² se infectaron con los baculovirus recombinantes que contienen las secuencias de VP1 de distintas cepas de RHDV. En primer lugar, se retiró el medio de cultivo, dejando sólo 5 mL al que se añadió la cantidad necesaria del stock de baculovirus para que la infección se produjera a una determinada m.o.i. (multiplicidad de infección o partículas infectivas/célula). Transcurrida 1 hora de adsorción incubando a 28 °C, se añadió el resto de medio de cultivo retirado antes de la infección. Los frascos se dejaron a 28 °C hasta pasadas 72 horas.

Tras 72 horas de infección, las células HF presentaron efectos citopáticos de modo que mostraban forma redondeada y, en su mayoría, estaban despegadas de la superficie del frasco. Dando unos golpes suaves en los laterales de los frascos las células se despegaron completamente. Las suspensiones celulares se centrifugaron a 750 g durante 10 min, descartando el sobrenadante, y resuspendiendo el pellet de células en PBS con inhibidores de proteasas (*Roche*, Basilea, Suiza). La rotura celular se hizo mediante ultrasonidos con una amplitud de entre 40-50 % y un total de 4 minutos, en pulsos de 10 segundos y 30 segundos de descanso, manteniendo siempre las muestras en hielo. Para asegurar la rotura celular se pasaron los extractos por jeringas de 21G unas 10 o 15 veces. Para eliminar restos celulares se realizó una centrifugación a 16000 rpm (24000 g) durante 1 hora a 4 °C y se recogió el sobrenadante.

El último paso de purificación fue común para ambos sistemas de expresión (intracelular o extracelular) se llevó a cabo mediante gradiente de densidad, para lo que se disolvieron 1,56 gramos de cloruro de cesio en la fracción libre de células. La

ultracentrifugación se realizó a 35000 rpm (125000 g) (rotor SW60, *Beckman Coulter*, California EE.UU.) durante 22 horas a 8 °C. La banda de color blanquecino correspondiente a las VLPs se recuperó y se diluyó en proporción 1:3 con PBS para volver a centrifugar de nuevo a 45000 rpm (208000 g), durante 2 horas y 30 minutos a 4 °C. Una vez decantado el sobrenadante, al pellet formado se añade PBS con inhibidores de proteasas y se deja a 4 °C toda la noche. Al día siguiente se analizaron mediante electroforesis SDS-PAGE las VLPs obtenidas y se cuantificaron empleando el método de estimación por análisis de imagen (*Image Studio, LI-COR*) tras teñir el gel con solución Coomassie.

Para la expresión y purificación de VLPs en células Sf9 en suspensión se cultivaron en un volumen de cultivo de 50 mL de medio X-Press sin suero fetal bovino, a 28°C en agitación a 150 rpm. Cuando alcanzó una densidad celular de aproximadamente 1×10^6 células/mL se infectaron con el baculovirus recombinante a una m.o.i. determinada. El cultivo se recogió a los 5 días post-infección (dpi). En primer lugar, para eliminar las células se centrifugó a 3000 rpm (1700 g) durante 10 minutos. El sobrenadante recuperado se centrifugó a 16000 rpm (24000 g) durante 20 minutos a 4 °C y se descartó el pellet. Una vez repartido el sobrenadante en tubos para ultracentrifugación (rotor SW28, *Beckman Coulter*), se centrifugaron a 26000 rpm (89000 g) durante 2 horas y 30 minutos a 4°C. El medio se eliminó por decantación y, tras secar los tubos, el pellet se dejó toda la noche en 2 mL de PBS pH 7,5 a 4 °C. Al día siguiente se analizaron y cuantificaron las muestras mediante estimación por electroforesis (SDS-PAGE).

3.8. SECUENCIACIÓN DE LA FRACCIÓN VARIABLE DEL ANTICUERPO MONOCLONAL 2D9

La secuencia de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo monoclonal 2D9 fue determinada mediante PCR de la región variable y amplificación rápida de los extremos de ADN complementario (5' RACE o *Rapid Amplification of cDNA Ends*). Este procedimiento fue realizado por el servicio de secuenciación de hibridomas de *Absolute Antibody Ltd* (Oxford, Reino Unido).

3.9. MÉTODOS INMUNOLÓGICOS DE CARACTERIZACIÓN Y/O DETECCIÓN DE PROTEÍNAS Y ANTICUERPOS

3.9.1. Western blot

Las proteínas separadas electroforéticamente mediante SDS-PAGE se transfirieron a membranas de nitrocelulosa 0,2 μm (*Bio-Rad*) aplicando una corriente eléctrica de 150 mA durante 1 hora en un aparato de transferencia húmeda (*Semi-Phor TE70, Hoefer Scientific Instruments*, California, EE.UU.). La electrotransferencia se desarrolló en presencia de tampón de transferencia (25 mM Tris, 192 mM glicina y 20 % metanol, pH 8,8). Las membranas se tiñeron con una solución de rojo Ponceau S al 0,01 % en ácido acético al 0,1 % para verificar la transferencia de las proteínas y se destiñeron con PBS en agitación.

Los sitios inespecíficos de unión de anticuerpos se bloquearon incubando la membrana en una solución de leche desnatada en polvo (Central Lechera Asturiana) al 5 % en PBS durante 45 minutos a temperatura ambiente en agitación. Tras realizar dos lavados de 5 minutos cada uno con PBS-Tw se añadió el anticuerpo primario, diluido en una solución de leche desnatada al 0,5 % en PBS-Tw (0,05 % de Tween 20 en PBS), y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación o bien toda la noche a 4 °C. Después de retirar la solución que contiene el anticuerpo primario se realizaron dos lavados con PBS-Tw durante 10 minutos en agitación. A continuación, se añadió el anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo en la solución de leche al 0,5 % en PBS-Tw y se dejó incubando durante 1 hora en oscuridad y agitación a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se retiró el anticuerpo secundario, se lavaron los filtros abundantemente con PBS-Tw tres veces durante 10 minutos en oscuridad y agitación. El revelado se realizó con ayuda del aparato *Odyssey*.

3.9.2. Dot blot

Sobre una membrana de nitrocelulosa se depositaron directamente gotas de extractos celulares o preparaciones purificadas de las proteínas deseadas en un volumen máximo de 1 μL por punto (o *dot*). Se dejaron secar al aire durante 15 o 20 minutos y el procedimiento a seguir fue similar al de Western blot (apartado 3.9.1) comenzando con el bloqueo de los sitios inespecíficos de unión de anticuerpos.

3.9.3. ELISAs para selección de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales frente a VLPs

Se realizó una primera selección mediante ELISA de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales generados frente a VLPs (RHDV-Nav10/11, RHDV-Ast89 o RHDV-Gal09/12). Para ello, se tapizaron placas de 96 pocillos de fondo plano (*Nunc™ MaxiSorp*) con 100 ng de VLPs por pocillo diluidas en PBS 1mM a pH 7,3 con azida sódica al 0,05 % (PBS-AS). Las placas se incubaron durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se descartó el sobrenadante, se añadió la solución de bloqueo (1 % BSA en PBS-AS) y se dejó durante 1 hora a 37°C. La placa se lavó tres veces con 200 µL de PBS-Tw por pocillo. Seguidamente, se añadieron 100 µL de los sobrenadantes procedentes de los cultivos de hibridomas y se incubaron durante unas 2 horas a 37 °C. Tras tres lavados con PBS-Tw, se añadieron 100 µL por pocillo de una dilución 1/1000 del anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (*Goat Anti-Mouse IgG (γ-chain specific)-Peroxidase*), en solución de bloqueo, dejando reaccionar a 37 °C durante 2 horas. Se hicieron dos lavados con PBS-Tw y se revelaron las placas mediante adición de 100 µL/pocillo de TMB (3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina), observando el desarrollo de color y se paró la reacción con 100 µL 2M de ácido sulfúrico (H₂SO₄). Se midió la absorbancia a 450 nm de longitud de onda. El sustrato TMB fue suministrado por *Sigma-Aldrich*.

3.9.4. ELISAs tipo sandwich

Placas de ELISA de 96 pocillos con fondo plano (*Corning Inc.*, Nueva York, EE.UU.) se tapizaron durante toda la noche (18 horas) a 4 °C con 100 ng/pocillo de anticuerpo monoclonal purificado (2D9 o 3A10) o suero policlonal de cabra, diluido en 100 µL de tampón carbonato-bicarbonato (*Sigma-Aldrich*). Las placas se lavaron una vez con 200 µL/pocillo de PBS-Tw y se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con 150 µL/pocillo de extracto de levadura al 1 % en PBS-Tw. Después de un lavado, se añadieron 100 µL de una dilución 1:80 en solución de bloqueo de los extractos de hígado, por duplicado y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Tras 5 lavados con 200 µL de PBS-Tw, se añadieron los anticuerpos correspondientes. Las placas tapizadas con monoclonales se incubaron con 100 µL de suero policlonal de cabra anti-RHDV-Nav10/11 diluido 100 veces en solución de bloqueo, mientras que las placas tapizadas con el suero policlonal de cabra se incubaron con 100 µL del monoclonal correspondiente (2D9 o 3A10) diluido

1000 veces. La incubación se realizó durante 1 hora a 37 °C. Las placas se lavaron 5 veces y se incubaron durante 1 hora a 37 °C con 100 µL de proteína G conjugada con peroxidasa o anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa diluido 1500 veces en solución de bloqueo. Por último, se lavaron las placas 5 veces y se añadió el sustrato de la peroxidasa, o-fenilendiamina, y se incubó 15 minutos en oscuridad. La reacción se paró con ácido sulfúrico 3M y se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de placas (*Sigma-Aldrich*, modelo 680).

La proteína G conjugada con peroxidasa utilizada es de la casa comercial *Thermo Fisher Scientific*TM.

3.9.5. ELISAs para la determinación de la presencia de anticuerpos frente a RHDV u otros antígenos en sueros de conejos

Para la determinación de la presencia de anticuerpos frente a RHDV en muestras de sueros de conejos se empleó el sistema comercial *INgezim* RHDV 17.RHD.K1 (INGENASA S.A., Madrid, España) siguiendo las instrucciones del fabricante.

En algunos casos se realizó una variante propia del ELISA indirecto utilizando como antígenos distintas VLPs o los propios antígenos vacunales que se administraron en las inmunizaciones experimentales. Estos antígenos se tapizaron en la placa en la cantidad de 100 ng/pocillo diluidos en PBS, dejándolos durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, tras retirar el sobrenadante de la placa, se añadieron 200 µL/pocillo de la solución de bloqueo (1 % de extracto de levadura en PBS-Tw) y se dejó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se hicieron tres lavados con 200 µL de PBS-Tw/pocillo y se añadieron diluciones de los sueros de conejo (generalmente se probaron en dilución 1/200) en solución de bloqueo. La placa se incubó durante 1 hora a 37 °C, y después se hicieron 5 lavados. A continuación, se pusieron 100 µL de una dilución 1/3000 en solución de bloqueo del anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (*Anti-Rabbit IgG (whole molecule)-HRPO*). Tras la incubación a 37 °C durante 1 hora, se lavó 5 veces la placa. El revelado se realizó añadiendo 100 µL de TMB, dejando durante 5-10 minutos en oscuridad y parando la reacción con 100 µL de H₂SO₄ 3N. La densidad óptica se midió a 450 nm.

3.9.6. ELISAs con anticuerpo monoclonal 2D9 purificado

En el caso del ELISA de competición con péptidos sintéticos, en primer lugar, hay que determinar la cantidad de anticuerpo monoclonal 2D9 que da un valor de densidad óptica a 450 nm de 2. Para ello, en una placa tapizada con 100 ng de VLPs de RHDV-N11 se probaron distintas diluciones del anticuerpo primario 2D9. Se determinó que la dilución 1/8000 era la deseada para realizar los posteriores ensayos de competición. Teniendo esto en cuenta, en los ensayos de competición se probaron diluciones seriadas en base 10 en solución de bloqueo (1 % ext. levadura en PBS-Tw) de los péptidos sintéticos. Dichas diluciones se mezclaron en proporción 1:1 con la dilución 1/4000 del anticuerpo 2D9 (dilución final de 1/8000). El control positivo se preparó del mismo modo, pero sin péptidos sintéticos. Las mezclas anticuerpo-péptidos se dejaron preincubando a 37 °C durante 2 horas. Tras hacer 3 lavados de la placa con las VLPs, se añadieron 100 µL/pocillo de las mezclas de péptidos y anticuerpo y se incubaron durante 2 horas a 37 °C. Tras 5 lavados con PBS-Tw, se pusieron 100 µL/pocillo de una dilución 1/5000 del anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (*Goat Anti-Mouse IgG Peroxidase*). Tras una incubación de 1 hora a 37 °C, se lavó la placa 5 veces y se añadió 100 µL de la solución de revelado TMB, observando el desarrollo de color. La reacción se paró con 100 µL 3N de ácido sulfúrico (H₂SO₄) y se midió la densidad óptica a 450 nm de longitud de onda.

Para los ensayos de interacción de 2D9 con distintos mutantes de dominios P, se tapizó la placa de ELISA con distintas cantidades de las construcciones mutantes, diluidas en PBS. Se dejaron toda la noche a 4 °C y al día siguiente se eliminó el exceso. Se añadió 100 µL de solución de bloqueo dejándolo durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras un lavado, el anticuerpo monoclonal 2D9 se añadió en dilución 1/8000 y se incubó 1 hora a 37°C. El resto del procedimiento se realizó como en el ELISA explicado previamente.

3.9.7. Citometría de flujo con lactobacilos

Los distintos lactobacilos recombinantes que expresan dominios P anclados a la pared celular se cultivaron en medio MRS broth en presencia de eritromicina, hasta una densidad celular de 0,8 (DO_{600nm}). Alícuotas de 200 µL de cada cultivo se recogieron y centrifugaron a baja velocidad (700 g) durante 5 minutos. Los sedimentos de células se lavaron tres veces con PBS y, al final se resuspendieron en 100 µL de PBS. Se añadieron 100 µL de una dilución 1/100 del suero policlonal Virlab a cada sedimento celular y se

incubó durante 1 hora en hielo. Se hicieron tres lavados con PBS por centrifugación y se volvieron a resuspender en 100 μ L de PBS. Se añadió 100 μ L de una dilución 1/100 del anticuerpo secundario que reconoce inmunoglobulina G de conejo (*Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG H&L*), y se incubó en hielo durante 30 minutos. Las células se fijaron con paraformaldehído al 2 % en PBS. Se lavaron de nuevo con PBS y se resuspendieron en PBS para su análisis en el Servicio de Ensayos Biotecnológicos y Biomédicos, utilizando un citómetro de flujo *Cytoflex S* (*Beckman Coulter*).

3.9.8. Hemaglutinación de glóbulos rojos humanos

Para la realización del ensayo de hemaglutinación con las construcciones de dominios P de RHDV-Ast89 y RHDV-Nav10/11 se utilizaron glóbulos rojos humanos de dos tipos: tipo 0 y tipo B; facilitados por el Centro Comunitario de Sangre y Tejidos de Asturias (Oviedo, Asturias). Para lavar los glóbulos rojos se tomó 1 mL a partir de los pellets de glóbulos y se transfirieron a un tubo falcon de 15 mL que contenía 9 mL de PBS frío (a 4°C) y se mezclaron suavemente por inversión. Se centrifugaron a 770 g durante 4 minutos a 4°C para sedimentar los glóbulos rojos. Se retiró el sobrenadante y se volvió a añadir 9 mL de PBS frío. Estos lavados se repitieron un total de 5 veces. Tras el último lavado se reservó a 4°C el pellet de glóbulos con una fina capa de PBS por encima para poder conservarlos en buen estado durante uno o dos días.

Para el ensayo de hemaglutinación se utilizaron placas de 96 pocillos con fondo cónico (*Nunc™*). Se depositaron 50 μ L de PBS frío en todos los pocillos de la placa y se hicieron diluciones seriadas en base 2 de las construcciones de dominios P correspondientes o de las VLPs incluidas en el ensayo como controles positivos. En la primera dilución de dominio P se añadió 14 μ g de la fusión con MBP y cola de histidinas en 50 μ L, mientras que de las VLPs se añadieron 10 μ g en 50 μ L en el primer pocillo. Estas cantidades se calcularon para poner estequiométricamente la misma cantidad de dominios P en forma de fusión y formando parte de VLPs. Las diluciones ensayadas para cada proteína o partícula a probar fueron desde 1/2¹ hasta 1/2²², manteniendo el último pocillo de todas las filas como control negativo sin ningún tipo de dominio P o VLP. A continuación, se añadió 100 μ L de una dilución de glóbulos rojos al 0,8 % en PBS a todos los pocillos de la placa y se incubaron a 4 °C durante 1 hora. Finalizada la incubación se hizo la lectura de las diluciones dónde se observaba hemaglutinación. Se realizó en paralelo la hemaglutinación de glóbulos rojos humanos tipo 0 y tipo B en placas por separado.

3.10. EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

El mantenimiento de animales y los diseños experimentales realizados en este trabajo se llevaron a cabo de acuerdo con el Real Decreto 53/2013 que adopta la directiva europea 2010/63/UE, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. Además, los procedimientos en la experimentación animal realizados fueron autorizados por el Comité de Ética de la Investigación del Principado de Asturias y con la autorización final de la Consejería de Agroganadería y Recursos Autóctonos del Principado de Asturias (PROAE 01/2014).

3.10.1. Inmunización de conejos

En todos los casos antes de comenzar los experimentos se comprueba que los animales no tienen anticuerpos frente a RHDV (*INgezim* RHDV, INGENASA S.A.). Se identifican individualmente con un número que se les pinta en la parte interna de ambas orejas.

Los antígenos vacunales que se emplearon en las distintas inmunizaciones se prepararon previamente en las concentraciones necesarias y en presencia o ausencia de adyuvantes. Las inyecciones se hicieron en un volumen de 0,5 mL por animal, por vía subcutánea en el lomo de los conejos. Aquellos animales considerados controles se inyectaron de la misma forma, pero con la solución sin antígeno a probar, ya fuese PBS o PBS con adyuvante.

El seguimiento en la producción de anticuerpos se realizó mediante extracciones de sangre de la vena marginal de la oreja. Tras separar el suero de las células sanguíneas se determinó la presencia de anticuerpos frente a RHDV.

3.10.2. Retos con virus RHDV

Las infecciones de conejos con virus RHDV se realizaron por vía subcutánea utilizando un volumen de 500 μ L por animal de la dilución determinada del stock de virus.

Seguidamente a las infecciones se comprobó cada 12 horas el estado general de los animales. En algunos casos dónde se observó una postración y posible sufrimiento de los animales éstos se sacrificaron por sobredosis anestésica.

La eutanasia de los conejos se realizó mediante sobredosis del anestésico Pentobarbital sódico (*Dolethal*), calculando la dosis necesaria por animal según las indicaciones del fabricante (*Vetoquinol S.A.*, Lure, Francia).

3.10.3. Neutralización del virus RHDV-Gal08/13 con anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales 2D9 y 3A10 empleados en la neutralización del virus RHDV-Gal08/13 de la nueva variante fueron purificados y suministrados por Certest. Las cantidades de anticuerpo utilizados por separado para neutralizar el virus fueron de 17,2 µg. Homogeneizados del virus al 10 % en PBS estéril se mezclaron con la cantidad indicada de 2D9 o 3A10, y se incubaron durante 45 minutos a 37 °C con agitación cada 15 minutos. Para hacer la prueba de neutralización en animales, se diluyeron las mezclas con PBS estéril para inocular a cada animal, por vía subcutánea, una dosis de 500 µL de una dilución 1/100000 (10 veces la DL50) del homogeneizado original del virus.

3.10.4. Generación de anticuerpos monoclonales

Para la generación de anticuerpos monoclonales frente a VLPs de RHDV-Nav10/11 o RHDV-Gal09/12 se inmunizaron ratones BALB/c con una dosis de 100 µg de VLPs en PBS cada 15 días. Se realizaron un total de 5 inmunizaciones por vía intraperitoneal. El proceso de inmunización de ratones y producción de hibridomas seleccionados, llevado a cabo por el laboratorio de Biotecnología y cultivos celulares de Servicios Científico-Técnicos (SCTs) de la Universidad de Oviedo, siguió procedimientos estándar (Fernández-Sánchez *et al.*, 2009). Los hibridomas seleccionados se subclonaron dos veces por dilución limitante, y se adaptaron progresivamente a medio libre de proteínas y suero UltraDOMA™ (Lonza) para la producción de anticuerpos monoclonales. La purificación de anticuerpos a partir de los sobrenadantes se realizó mediante una cromatografía de interacción hidrofóbica usando una columna de fenil-sefariosa y un sistema ÄKTA de cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC). La columna y el sistema ÄKTA de cromatografía son de la casa comercial *GE Healthcare Life Science*. La determinación del isotipo de inmunoglobulina producido por los hibridomas se realizó empleando el sistema comercial de isotipado de anticuerpos monoclonales de ratón IsoTrip™ (*Roche Diagnostics GmbH*, Mannheim, Alemania).

3.11. PROGRAMAS INFORMÁTICOS

3.11.1. Análisis de secuencias de ADN y proteínas

Se empleó el programa *Vector NTI Suite 8* (*InforMax, Inc.*, Maryland, EE.UU.) en el diseño de construcciones recombinantes o mutantes, diseño de oligonucleótidos y predicción de sitios de restricción, así como, la construcción de las secuencias aminoacídicas procedente de proteínas de fusión o mutantes.

Con el programa *Chromas v2.6.4* (*Technelysium Pty Ltd.*, Queensland, Australia) se visualizaron los resultados de secuencias nucleotídicas procedentes de la Unidad de Secuenciación. La aplicación *Align* de *Vector NTI* se utilizó para procesar y comprobar fragmentos de ADN secuenciados.

Los alineamientos mostrados en figuras de las secuencias de ADN y proteínas en el presente trabajo se realizaron con la aplicación de *MegAlign* (*Lasergene 7.0, DNASTAR, Inc.*, Wisconsin, EE.UU.).

Los mapas de los vectores de integración para la generación de lactobacilos recombinantes se obtuvieron mediante el uso del sistema *SnapGene® Viewer 3.3.4*.

El programa informático *PyMOL v1.1* (*Molecular Graphics System, DeLano Scientific LLC.*, California, EE.UU.) fue utilizado en la presentación de modelos tridimensionales de proteínas. La predicción de los modelos de interacción entre proteínas se hizo con la plataforma informática disponible en internet *ClusPro 2.0* (*Protein-protein docking, Structural Bioinformatics Lab*, Universidad de Boston, Massachusetts, EE.UU.). Por otro lado, la herramienta informática utilizada para la generación de un modelo de la fracción variable de 2D9 fue *PIGS* (*Prediction of Immunoglobulin Structure*) (Marcatili *et al.*, 2008).

3.11.2. Visualización y análisis de imagen

Las imágenes resultantes de análisis por Western blot, Dot blot o geles de proteínas teñidos con Coomassie se analizaron y/o mostraron con ayuda del software *Image Studio v5.2.5* (*LI-COR*).

3.11.3. Tratamiento de datos y análisis estadísticos

Los análisis estadísticos de este trabajo se realizaron con el apoyo de la Unidad de Consultoría Estadística de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo. El programa utilizado fue el programa R (*R Development Core Team*), versión 3.4.4 (Team Core, 2018).

Los datos de densidad óptica obtenidos mediante ELISA de competición con péptidos sintéticos se normalizaron en porcentajes con respecto al control positivo (sin péptidos) y se corrigieron también con el control negativo (pocillos sin tapizar), siguiendo el procedimiento sugerido por (Sanchez et al., 2002) y empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ DO relativa} = \frac{DO \text{ muestra} - DO \text{ control negativo}}{DO \text{ control positivo} - DO \text{ control negativo}} \times 100$$

Posteriormente, se compararon los porcentajes de densidad óptica relativa con respecto al control positivo, que sería el valor de 100 %, a través del test t de Student o test de Wilcoxon para una muestra, según se verificase o no la hipótesis de normalidad. El nivel de significación empleado es de 0,05. El mismo tratamiento de datos y análisis estadístico se realizó para los resultados de densidad óptica obtenidos en los ELISAs con los dominios P de RHDV-Nav10/11 mutantes. En ese caso, la normalización de los datos se hizo con respecto a la señal de 2D9 obtenida frente al dominio P de RHDV-Nav10/11 nativo (control positivo), y considerando como control negativo la señal frente al dominio P de RHDV-Ast89.

Para los datos de densidad óptica obtenidos en sueros de animales vacunados oralmente con lactobacilos recombinantes, los análisis estadísticos consistieron en, una vez obtenida la verificación de normalidad o no de los datos, y tras un análisis de la homogeneidad de la varianza, se realizó un test de Tukey o un test t de Student. Si los datos obtenidos no seguían la normalidad y las varianzas no eran homogéneas el test empleado fue Kruskal-Wallis.

Para determinar las diferencias en los niveles de anticuerpos en un mismo suero frente a distintas VLPs, como en el caso del experimento de vacunación con extractos de larvas que expresan VLPs, VLPs purificadas o P-GST, se hicieron distintos análisis estadísticos en función de si los resultados de densidad óptica obtenidos mediante ELISA seguían o

no la normalidad. En el primer caso se hicieron test de T-Student o test Welch y, en el segundo caso, test de Wilcoxon.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERIZACIÓN ANTIGÉNICA DE LA PROTEÍNA PRINCIPAL DE LA CÁPSIDA (VP1) DE LA NUEVA VARIANTE DEL RHDV (RHDVb)

Las existencia de diferencias antigénicas en la cápsida del virus clásico y la nueva variante de RHDV ha sido demostrada anteriormente (Bárcena *et al.*, 2015; Dalton *et al.*, 2012). Actualmente, hay disponibles anticuerpos monoclonales producidos frente a VP1 de RHDV clásico (Capucci *et al.*, 1995). En el presente trabajo nos hemos propuesto la caracterización de anticuerpos monoclonales frente a RHDVb y la producción y caracterización de anticuerpos monoclonales frente a un aislado de RHDVa y, así, poder disponer de anticuerpos monoclonales que sean específicos frente a esos virus y otros que reconozcan a la vez varios tipos de RHDV. Con estas herramientas se realizaría un mejor estudio de las diferencias antigénicas entre ambos virus. A su vez, se espera obtener herramientas con aplicaciones diagnósticas, así como, información útil para generar posibles vacunas frente al virus.

4.1.1. Producción de anticuerpos monoclonales frente a VP1 de distintos aislados de RHDV (RHDVb y RHDVa)

Para abordar este objetivo, en primer lugar, se procedió a la producción de las VLPs de ambos tipos de RHDV. Para ello se disponía del gel de la proteína VP1 completa clonado en construcciones de baculovirus que se propagaron en células de insecto. La capacidad de autoensamblaje de esta proteína dio lugar a la formación de VLPs que posteriormente fueron purificadas por ultracentrifugación. Este procedimiento se realizó con dos secuencias de VP1 pertenecientes a distintos aislados de RHDV, uno de la nueva variante, RHDVb (RHDV-Nav10/11) y otro del tipo RHDVa (RHDV-Gal09/12) perteneciente a un aislado caracterizado en nuestro laboratorio a partir de un caso de RHD ocurrido en Galicia.

La inmunización de ratones (BALB/c) se realizó en las instalaciones de los Servicios Científico Técnicos de la Universidad de Oviedo por separado para cada uno de los tipos de VLPs (RHDV-Nav10/11 y RHDV-Gal09/12). Se hicieron un total de 5 inmunizaciones, cada una con una dosis de 100 µg de VLPs por animal. Las células hibridomas generadas se multiplicaron en cultivo y los sobrenadantes donde liberaban los anticuerpos producidos, posteriormente, se analizaron mediante diferentes técnicas inmunológicas. La producción de anticuerpos monoclonales con un cierto interés para

nuestro estudio fue la causa por la que se seleccionaron algunas cepas de hibridomas para seguir con los procesos de subclonación y obtención de mayor cantidad de sobrenadantes para la posterior caracterización de los anticuerpos que producen.

Según la reactividad de los anticuerpos obtenidos a partir de los hibridomas, se seleccionaron y subclonaron algunos de ellos obteniendo varios hibridomas cuyos sobrenadantes también se analizaron posteriormente, mediante ELISA o Dot blot observando si mantenían la reactividad inicial o si por el contrario la perdían, y por tanto tenían que ser descartados. Todos los hibridomas originales y posteriores subclones obtenidos tras la inmunización con cada una de las VLPs se especifican en la **Tabla S1** del Anexo.

4.1.2. Estudio de la especificidad de los anticuerpos monoclonales

Tras la generación de los hibridomas iniciales se analizó la reactividad frente a VLPs mediante ELISA indirecto de los anticuerpos presentes en los sobrenadantes de los cultivos cuyos resultados determinarían la idoneidad de los hibridomas para seguir con su cultivo y posterior subclonación. Para ello, se produjeron VLPs de un aislado de RHDV del genogrupo 1 (RHDV-Ast89), para poder comparar la reactividad de los anticuerpos monoclonales frente a RHDV-Ast89, RHDV-Gal09/12 y RHDV-Nav10/11. El sistema empleado para la producción de estas VLPs fue el mismo que para las anteriores mencionadas, a partir de un vector pTriEx con la secuencia completa de VP1 de RHDV-Ast89 (laboratorio de F. Parra) para la generación de baculovirus recombinantes y su expresión en células de insecto.

El trabajo de producción de anticuerpos monoclonales mediante la inmunización con VLPs de RHDV-Nav10/11, así como la subclonación y selección mediante reactividad por Dot blot de los hibridomas obtenidos, se había realizado con anterioridad al inicio de este trabajo de tesis. Por tanto, no se muestran los resultados obtenidos en los análisis intermedios de los distintos subclones, sino que se mostrará, más adelante en el apartado 4.1.4, la caracterización que se ha realizado de los anticuerpos producidos por los hibridomas ya seleccionados, según su reactividad frente a distintos tipos de VP1. Los cinco subclonados y seleccionados en el laboratorio de F. Parra se denominaban 2D9.23, 3A10.14, 8E10, 6B9.8 y 2A11.14. La reactividad obtenida en los análisis por Dot blot frente a VP1 de distintos RHDV se muestran en la **Tabla 8** (datos cedidos por el laboratorio F. Parra). Como puede observarse, los anticuerpos producidos por los

hibridomas 3A10.14, 2A11.14, 6B9.8 y 8E10 parecían reconocer tanto a las VLPs pertenecientes a aislados del virus clásico RHDV-G1 como de la nueva variante RHDVb. Sin embargo, el anticuerpo producido por 2D9 mostró ser específico frente a VLPs del aislado de la nueva variante RHDV-Nav10/11.

Tabla 8. Reactividad en Dot blot de anticuerpos monoclonales frente a distintos tipos de VP1.

Subclones seleccionados	VLPs RHDV-Ast89	VLPs RHDV-Nav10/11
2D9.23	-	+
3A10.14	+	+
2A11.14	+	+
6B9.8	+	+
8E10	+	+

Nota: Reacción positiva (+); no se observa reacción (-).

Los resultados de los ELISAs para los hibridomas iniciales obtenidos tras la inmunización de los ratones con las VLPs de RHDV-Gal09/12 se muestran en la **Figura 6**. En el caso de la inmunización de ratones con VLPs de RHDVa se obtuvieron nueve clones distintos de hibridomas nombrados como 7, 11, 12, 30, 51, 78, 82, 105 y 125, que parecen producir anticuerpos frente a esas VLPs (**Figura 6**). Sin embargo, en el primer escrutinio por ELISA indirecto se observan diferencias importantes en la intensidad de reacción frente a las VLPs. Los hibridomas numerados como 7, 30, 51 y 105 dan valores aparentemente muy inferiores a los sobrenadantes de los hibridomas 78 y 82 (**Figura 6**), incluso algunos de ellos, 11 y 12, presentan valores cercanos al punto de corte de la técnica de ELISA.

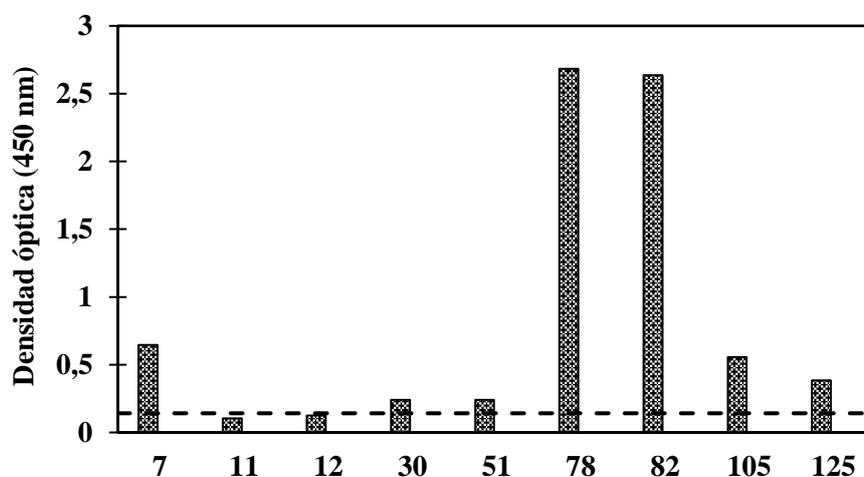


Figura 6. Análisis de la producción de anticuerpos en distintos hibridomas mediante ELISA indirecto frente a VLPs de RHDV-Gal09/12.

Los mismos sobrenadantes obtenidos de los hibridomas iniciales se analizaron mediante Dot blot para investigar su reactividad frente a los distintos tipos de VLPs de RHDV (RHDV-Nav10/11, RHDV-Ast89 y RHDV-Gal09/12). Los resultados de todas las pruebas de reactividad se muestran en la **Figura 7**.

En el caso de los hibridomas generados tras la inmunización de ratones con VLPs de RHDVa, el hibridoma 11 no produce anticuerpos capaces de reconocer a cualquiera de los tipos de VLPs, confirmando los resultados obtenidos en ELISA frente a VLPs de RHDVa (**Figura 6**). Por esta razón, se descartó su uso en las siguientes subclonaciones y análisis de reactividad y caracterización de anticuerpos. Los sobrenadantes de los hibridomas 7 y 105 parecen reaccionar frente a VLPs de RHDVa, aunque también interaccionan débilmente con VLPs de RHDV-Nav10/11. El hibridoma 30 es el único que produce anticuerpos aparentemente específicos frente a las VLPs de RHDVa. La interacción frente a los tres tipos de VLPs aparece en sobrenadantes de los hibridomas 51 y 125, aunque en la señal mediante Dot blot es más débil en el sobrenadante del 51 frente a las VLPs de RHDV-Nav10/11. En el caso de los hibridomas 78 y 82 producen anticuerpos que reaccionan con las VLPs de RHDV clásicos pertenecientes al genogrupo 1 (RHDV-Ast89) y al genogrupo 6 (RHDV-Gal09/12).

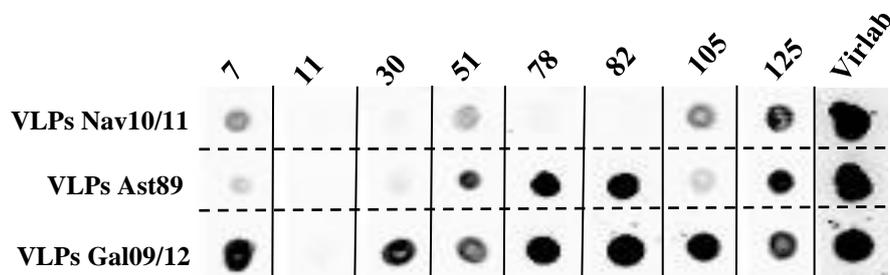


Figura 7. Análisis de reactividad en Dot blot de anticuerpos monoclonales frente a distintos tipos de VLPs (RHDV-Nav10/11, RHDV-Ast89 o RHDV-Gal09/12). Virlab (suero policlonal anti-RHDV).

Los sobrenadantes de los siguientes subclones derivados de los hibridomas obtenidos por inmunización de ratones con VLPs de RHDVa, se analizaron mediante Dot blot frente a los tres tipos de VLPs de RHDV (RHDV-Nav10/11, RHDV-Ast89 y RHDV-Gal09/12). Los resultados recogidos en la **Figura 8** muestran la reacción frente a las VLPs de los sobrenadantes de cada hibridoma inicial (cultivado de nuevo, para obtener más cantidad de sobrenadante) y los subclones obtenidos a partir de él. En cuanto al hibridoma 78 no se consiguieron obtener subclones viables, sin embargo, se siguió empleando el

sobrenadante inicial para estudiar este anticuerpo monoclonal puesto que reconoce específicamente las VLPs de RHDV clásico (G1 y G6), pero no las VLPs de la nueva variante. A partir del hibridoma 7 se obtuvieron tres cepas, 7.1, 7.2 y 7.5, que parecían mantener la reacción frente a VLPs de RHDVa. Los subclones 30.9, 30.14, 51.5 y 51.5 derivados de los hibridomas 30 y 51, respectivamente, parecen perder la capacidad de producir los anticuerpos monoclonales que reconocen VLPs de RHDVa y RHDV-Ast89 que sí mantienen los anticuerpos de los hibridomas de los que proceden. Con respecto a los subclones 82.2 y 82.3 los anticuerpos monoclonales que producen siguen reconociendo específicamente las VLPs de RHDV clásicas, al igual que el hibridoma 82 inicial. La reacción de los anticuerpos del 125 y los subclones 125.6 y 125.8 frente a los tres tipos de VLPs empleados en Dot blot es débil. Los anticuerpos monoclonales producidos por el hibridoma 105 y los subclones 105.3 y 105.8 parecen ser específicos frente a RHDVa, aunque la señal mostrada en Dot blot es bastante débil (**Figura 8**).

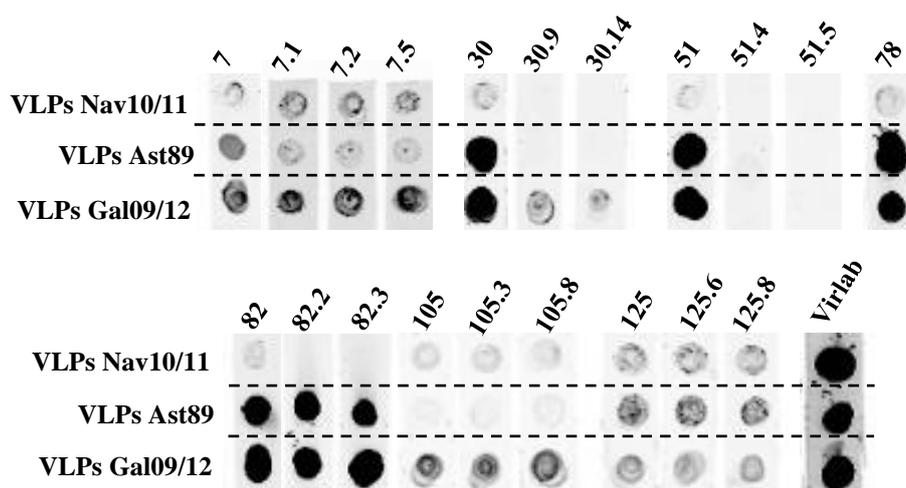


Figura 8. Análisis Dot blot de la reactividad de sobrenadantes procedentes de hibridomas frente a distintos tipos de VLPs (RHDV-Nav10/11, RHDV-Ast89 o RHDV-Gal09/12).

A partir de estos resultados se seleccionó uno de los subclones para caracterizar si el anticuerpo monoclonal que produce interaccionaba con un epítipo lineal o conformacional, y si fuese posible determinar en qué región de la VP1 se une. En el caso de los hibridomas producidos frente a VLPs de RHDVb los seleccionados fueron: 2A11.14, 6B9.8, 8E10, 2D9.23 y 3A10.14. En el caso del hibridoma 8E10 no se pudo obtener subclones estables, pero se siguió con la caracterización del anticuerpo monoclonal porque podría ser un anticuerpo general que reconoce las VLPs de RHDV-

Nav10/11 y RHDV-Ast89 mediante ELISA. Los anticuerpos monoclonales producidos por 2D9.23 y 3A10.14, se purificaron dada la reactividad que presentaban, puesto que uno parecía ser específico frente a la nueva variante (2D9.23) y el otro reconocía los tres tipos de VLPs probadas (3A10). Los hibridomas seleccionados tras la inmunización de ratones con VLPs de RHDV-Gal09/12 fueron 7.5, 30.14, 51.5, 78, 82.2, 105.8.

4.1.3. Clonación y producción de fragmentos solapantes de VP1 de RHDV-Nav10/11

Para investigar la región de la proteína VP1 dónde interaccionan los anticuerpos monoclonales previamente seleccionados se llevó a cabo la clonación de fragmentos de esta proteína del aislado RHDV-Nav10/11.

En nuestro laboratorio disponíamos de un vector donador (pTriEx) que contiene la secuencia de la proteína VP1 del aislado RHDV-Nav10/11 (cedido por KP Dalton), a partir del que se obtuvieron las secuencias de los fragmentos de VP1 solapantes para clonarlos por separado en el vector pGex-2T. Así, fragmentos solapantes de la proteína VP1 de RHDV-Nav10/11 se clonaron como fusiones con GST (Glutathion-S transferasa) en *Escherichia coli* (BL21) (**Figura 9A**). Una vez comprobadas las secuencias de cada uno de los fragmentos, se realizó el análisis de lisados celulares tras la inducción con isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Además, se demostró mediante Western blot la presencia de las proteínas de fusión gracias a la reacción con un anticuerpo monoclonal de ratón frente a la proteína GST (**Figura 9B**), obteniéndose los tamaños moleculares esperados para cada una de las fusiones. En el caso del dominio P completo de la proteína VP1, se disponía en el laboratorio de la secuencia optimizada para su expresión en *Escherichia coli* clonada en el plásmido pMalc2X-DomPN11opt (cedido por el laboratorio del Dr. Grant Hansman), a partir del cual se realizó la subclonación a un vector pGex-4T (se encuentra detallado más adelante, en el apartado 4.3.3).

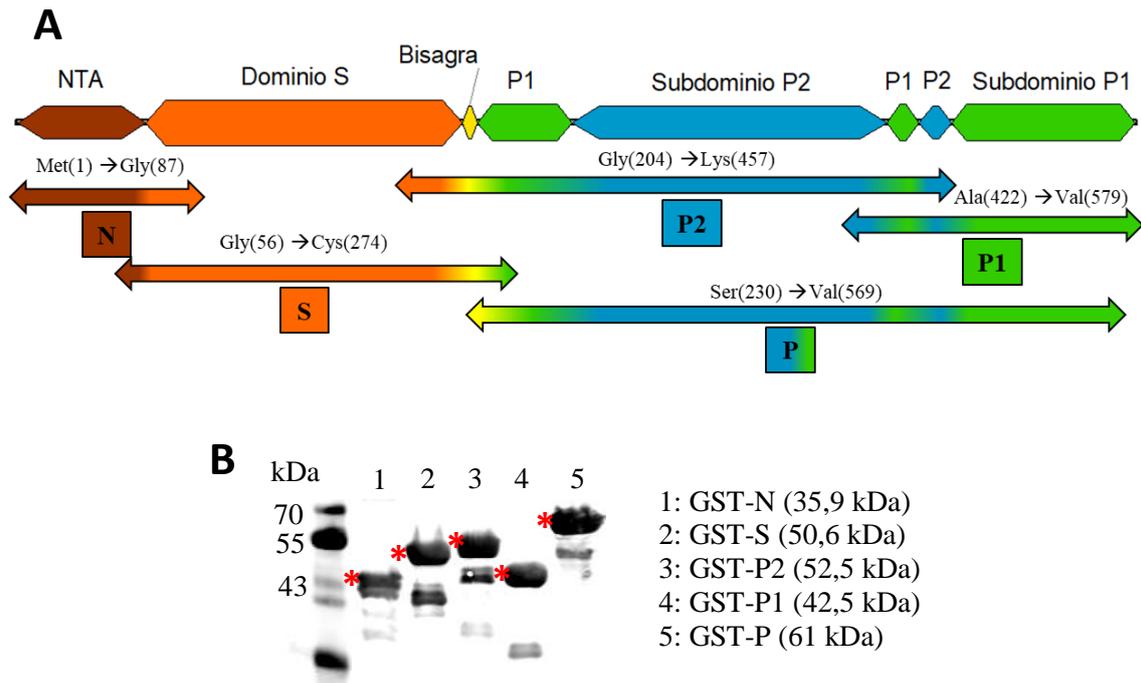


Figura 9. Producción de fragmentos solapantes de la proteína VP1 de RHDV-Nav10/11. **A.** Representación esquemática de las regiones de VP1 clonadas por separado en forma de proteínas de fusión con GST. Se indican los residuos aminoacídicos de los extremos N y C y las posiciones que ocupan dentro de la proteína VP1. **B.** Análisis Western blot de extractos celulares de *E. coli* que expresan las proteínas de fusión, empleando un anticuerpo monoclonal comercial de ratón frente a la proteína GST.

4.1.4. Caracterización de anticuerpos monoclonales generados frente a VLPs de RHDV

Para la caracterización de los anticuerpos monoclonales se utilizaron distintas técnicas inmunológicas para determinar la unión de cada anticuerpo son su epítipo lineal o conformacional dentro de la VP1. Para ello se estudió la interacción de los anticuerpos monoclonales obtenidos por inmunización tanto con VLPs de RHDV-Nav10/11 como con RHDV-Gal09/12, presentes en sobrenadantes de cultivos de hibridomas o con anticuerpos purificados. Los antígenos empleados en este estudio fueron VLPs derivadas de RHDV-Nav10/11, RHDV-Ast89 y RHDV-Gal09/12, así como frente a los fragmentos solapantes de la proteína VP1 de RHDV-Nav10/11.

En primer lugar, para la caracterización de los diferentes anticuerpos monoclonales realizamos un estudio de su capacidad para reconocer distintos epítopos lineales de la proteína VP1 mediante Western blot. Los antígenos empleados en este análisis consistieron en distintos tipos de VLPs, así como los fragmentos solapantes de VP1 de

RHDV-Nav10/11 fusionados con GST. Como puede observarse en la **Figura 10** los anticuerpos monoclonales 2A11, 6B9, 30 y 51 interactúan inespecíficamente con proteínas celulares, diferentes de los antígenos estudiados. Cinco de los once monoclonales (2D9, 7, 78, 82 y 105) no reaccionan en Western blot con VLPs o fragmentos de VP1 de RHDV-Nav10/11, lo cual indicaría que reconocen epítomos no lineales. En el caso de los anticuerpos 3A10 y 8E10 puede observarse que reaccionan con los tres tipos de VLPs, confirmando los resultados obtenidos por Dot blot, y más concretamente con un epítomo lineal que se encuentra dentro del dominio S de la proteína VP1 (**Figura 10**).

Posteriormente, se realizó un Dot blot para determinar si los anticuerpos monoclonales que no interactuaban con su epítomo mediante Western blot, no lo hacen porque requieren que la proteína se encuentre en su conformación nativa. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 11**, donde se observa que los anticuerpos monoclonales generados frente a VLPs de RHDV-Nav10/11, 2D9.23, 2A11.14, 6B9.8, 3A10.14 y 8E10, reaccionan todos frente a las mismas VLPs frente a las que fueron producidos. Cuatro de ellos, 2A11.14, 6B9.8, 3A10 y 8E10, también lo hacen frente a VLPs del aislado RHDV-Ast89. Sin embargo, teniendo en cuenta los resultados obtenidos previamente en Western blot (**Figura 10**), los monoclonales 2A11.14 y 6B9.8 podrían estar interactuando inespecíficamente con proteínas celulares procedentes del cultivo celular donde se produjeron las VLPs. Los anticuerpos 3A10 y 8E10 son los únicos capaces de reconocer las VLPs procedentes de tres tipos de RHDV, además, se demuestra que los epítomos con los que interactúan se encuentran dentro del dominio S de la proteína VP1, puesto que reaccionan con el fragmento GST-S. De este modo, el único anticuerpo monoclonal que es específico frente al aislado de la nueva variante de RHDV, RHDV-Nav10/11, es 2D9. Sin embargo, curiosamente, este anticuerpo no muestra reacción con los fragmentos parciales de la proteína VP1, en Dot blot. Esto mismo también ocurre con los anticuerpos 2A11.14 y 6B9.8.

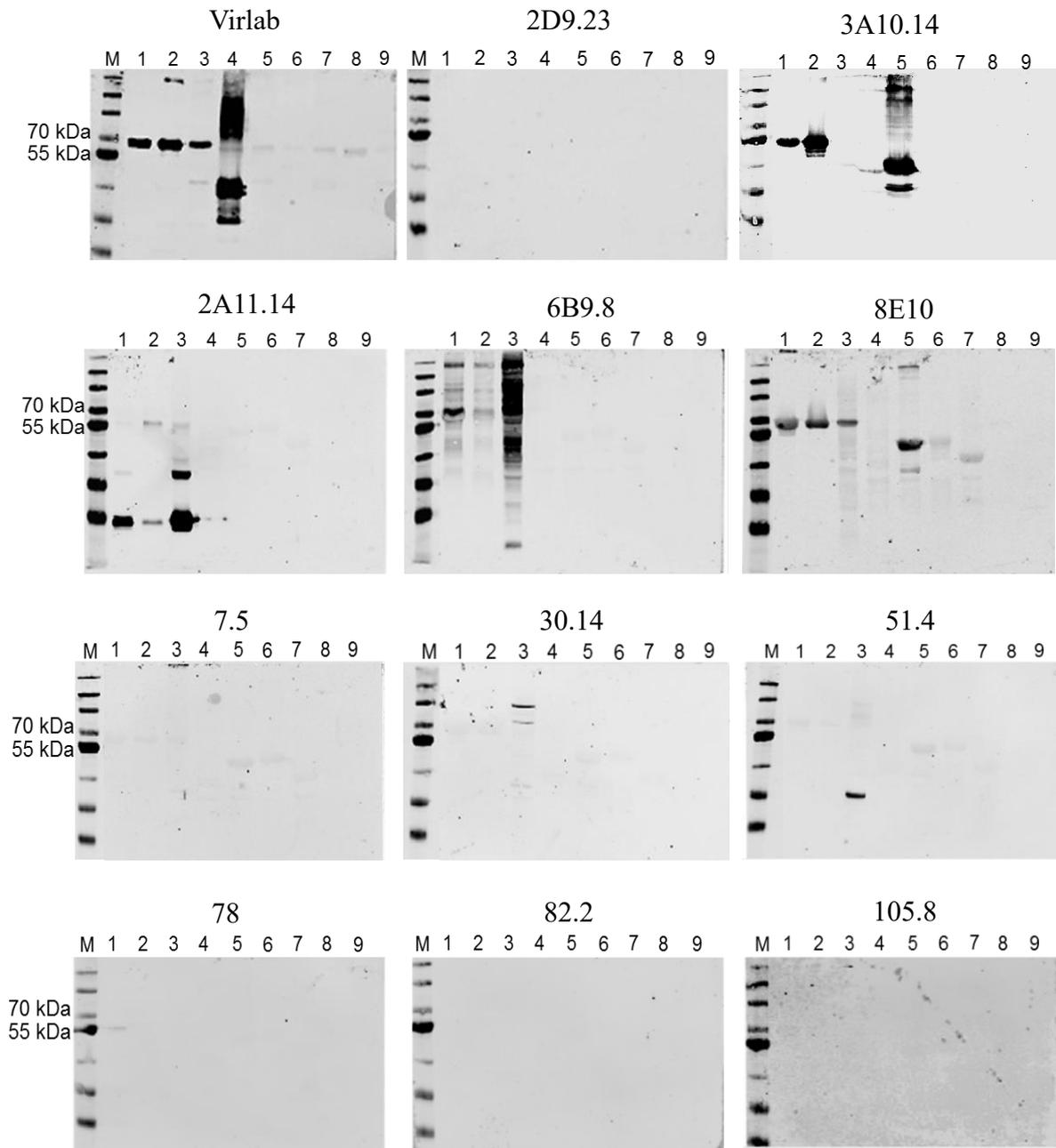


Figura 10. Análisis de la reactividad en Western blot de anticuerpos monoclonales frente a distintos tipos de VLPs (1-3), proteínas de fusión (4-8) o GST (9). (1) RHDV-Nav10/11; (2) RHDV-Ast89; (3) RHDV-Gal09/12; (4) GST-N; (5) GST-S; (6) GST-P2; (7) GST-P1; (8) GST-P.

En el caso de los anticuerpos obtenidos tras la inmunización con VLPs de RHDV-Gal09/12, se observa en la **Figura 11**, que mantienen la misma especificidad frente a VLPs que la mostrada en la **Figura 8**, dónde ninguno reconoce las VLPs de la nueva variante del virus. Los anticuerpos producidos por los subclones 7.5, 30.14 y 105.8 parecen ser específicos frente a las VLPs de RHDV-Gal09/12, y los producidos por 51.5, 78 y 82.2 reconocen las VLPs de los aislados del RHDVG1 como del RHDVa. Por otro lado, y cómo era de esperar, ninguno de los anticuerpos obtenidos de la inmunización frente a VLPs de RHDV-Gal09/12 interaccionan con los fragmentos parciales de VP1 de RHDV-Nav10/11, dado que tampoco lo hacen con las VLPs del mismo tipo (**Figura 11**).

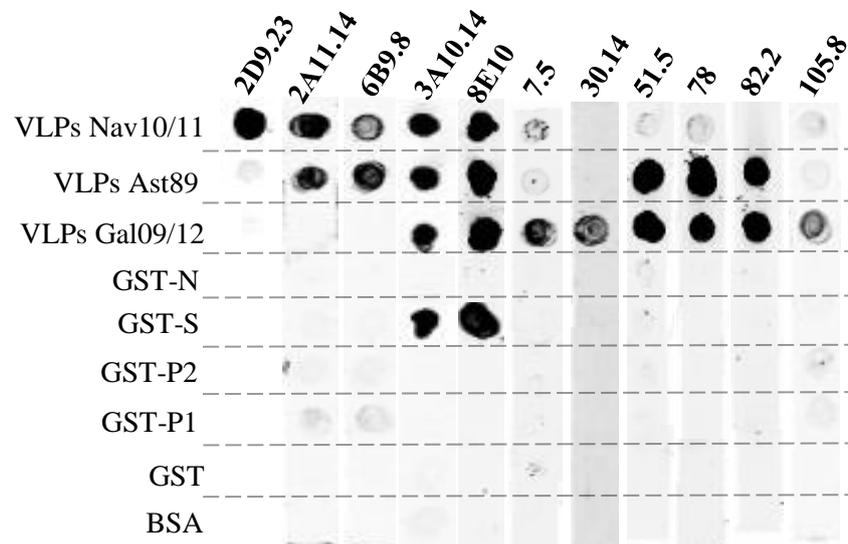


Figura 11. Análisis de la reactividad en Dot blot de los anticuerpos monoclonales frente a distintos tipos de VLPs, proteínas de fusión con GST, GST o BSA.

Durante la clonación de los fragmentos solapantes de VP1 de RHDV-Nav10/11 se obtuvo un clon de manera fortuita que expresaba una proteína mutada de forma puntual dentro del dominio S (GST-Smut). Tras comprobar la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de esta región (**Figura 12A y 12B**), y el modelo tridimensional de la proteína VP1 de RHDV (**Figura 12C**) se observó que el cambio se encontraba en el residuo que ocupa la posición 201 dentro de la proteína VP1. Los extractos de *E. coli* que expresan esta construcción se enfrentaron a los monoclonales 3A10 y 8E10 en Western blot. Los resultados mostrados en la **Figura 12D** muestran que estos anticuerpos pierden la

capacidad de unión al dominio S mutante de VP1 cuando el residuo original de prolina es sustituido por leucina.

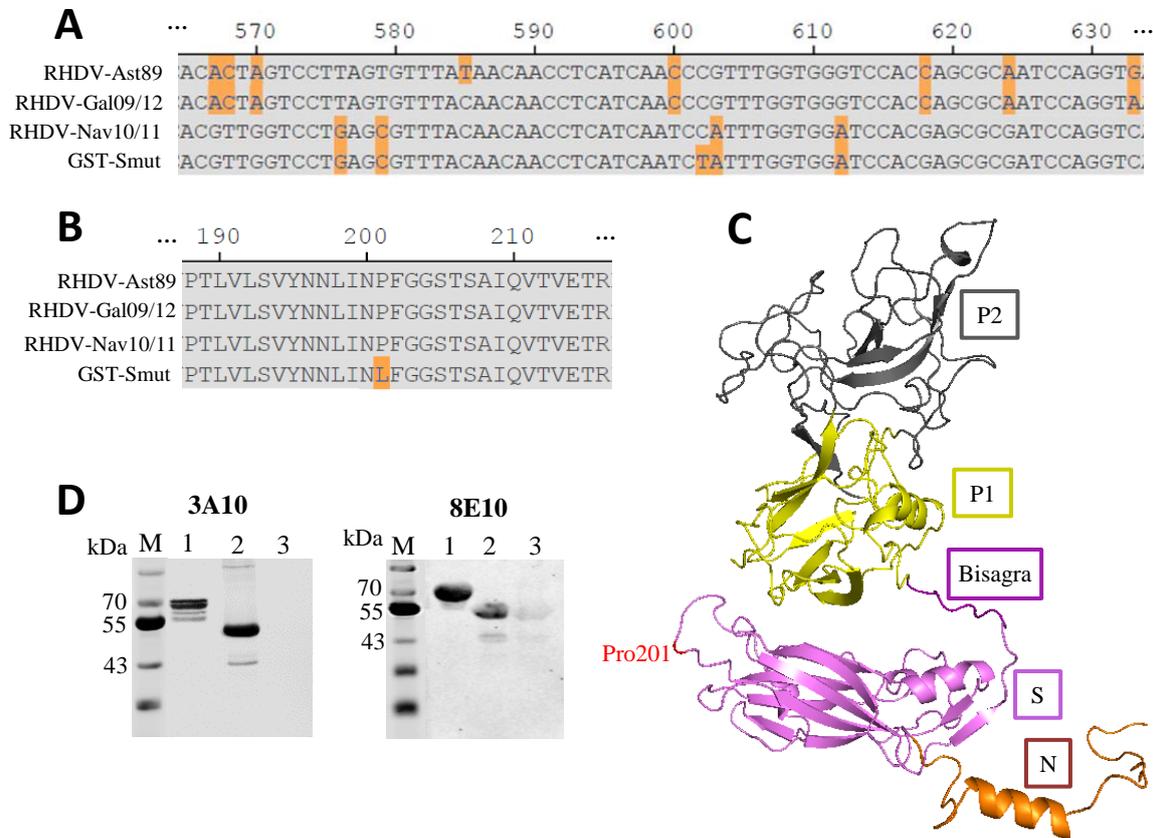


Figura 12. Estudio de interacción de los anticuerpos monoclonales que reconocen VLPs de tres tipos de RHDV. **A.** Alineamiento parcial de secuencias codificadoras de VP1 de distintos tipos de RHDV (RHDV-Ast89, RHDV-Gal09/12 y RHDV-Nav10/11), y del dominio S mutado de forma puntual. **B.** Alineamiento parcial de los residuos aminoacídicos correspondientes a la región del dominio S de VP1 donde se localiza la mutación puntual. **C.** Análisis de la reactividad en Western blot de los anticuerpos 3A10 y 8E10 frente a: (1) VLPs de RHDV-Nav10/11; (2) fusión GST-S; (3) fusión GST-Smut. **D.** Modelo estructural de la proteína VP1 de RHDV.

Dado los resultados obtenidos con los hibridomas seleccionados, 2D9.23, 3A10.14 y 82.28, se purificaron las inmunoglobulinas presentes en los sobrenadantes. La determinación del isotipo de inmunoglobulina mostró que pertenecen al subtipo IgG1, en todos los casos.

4.2. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN DEL ANTICUERPO MONOCLONAL 2D9 CON SU EPÍTOPO

El anticuerpo monoclonal 2D9 se obtuvo tras la inmunización de ratones hembra adultos BALB/c con VLPs de RHDV-Nav10/11 purificadas. La selección de este anticuerpo se basó en su reacción específica únicamente frente a VLPs de la nueva variante en ensayos ELISA y Dot blot, siendo el único que mostró dicha especificidad. En cuanto a los intentos de mapear su epítipo dentro de la proteína VP1 de RHDV-Nav10/11, utilizando fragmentos solapantes como proteínas de fusión con GST (**Figura 8**), éstos fueron en todos los casos negativos. Sin embargo, cuando se empleó la construcción del dominio P completo fusionado con GST en ensayos Dot blot pudo detectarse la unión del anticuerpo (**Figura 13**). Estos resultados sugieren que este anticuerpo interactúa con epítopos no lineales de la proteína y que, además, requiere de la presencia del dominio P completo y correctamente plegado para su unión.

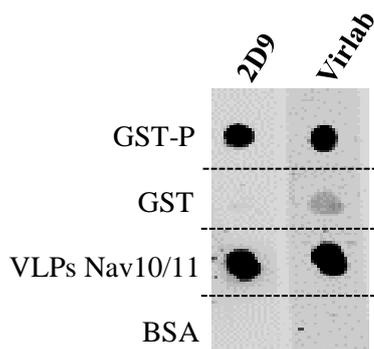


Figura 13. Análisis de la reactividad en Dotblot del anticuerpo monoclonal 2D9 con distintos antígenos. Extractos celulares que contienen la fusión GST-P o la proteína GST, 1 µg de VLPs de RHDV-Nav10/11 o 1 µg de BSA. Virlab es un antisuero policlonal frente a RHDV.

Dada la relevancia diagnóstica de este anticuerpo (ver más adelante apartado 4.2.5), tanto en ELISAs para la detección diferencial y cuantificación de antígeno de RHDVb en muestras de hígado de conejos (Dalton *et al.*, 2018c), como en un sistema inmunocromatográfico rápido para la detección específica del RHDVb (Dalton *et al.*, 2017), resulta relevante realizar un estudio más detallado de la interacción antígeno-anticuerpo.

4.2.1. Estudio de la capacidad neutralizante del anticuerpo 2D9

La capacidad neutralizante de los anticuerpos puede determinar la posibilidad de eliminar el virus o evitar que produzca la infección y la enfermedad en el huésped. A su vez, es importante conocer si existen regiones o secuencias de la cápsida viral que puedan ser diana para la generación de anticuerpos neutralizantes. Por tanto, en el presente

trabajo, y conociendo el dominio de la proteína VP1 al que se une el anticuerpo monoclonal 2D9, se ha realizado un ensayo de neutralización del virus con este anticuerpo.

Para poder analizar comparativamente la capacidad neutralizante de 2D9 se estudió en paralelo otro monoclonal, el denominado 3A10, que interacciona con el dominio S de la proteína VP1 tanto de la nueva variante como del virus clásico. La neutralización del virus en el laboratorio se realizó mezclando las mismas cantidades (17,2 μ g de IgG purificada) de ambos monoclonales separadamente con el virus RHDV-Gal08/13, y dejándolo reaccionar a 37 °C durante 45 minutos. Posteriormente, para comprobar si se había producido la neutralización del virus por los monoclonales, se realizó un experimento de infección con conejos. Se establecieron tres grupos de animales de 30 días de edad, con dos conejos por grupo. La elevada tasa de mortalidad (100 %) que causa el aislado RHDV-Gal08/13, determinada previamente en nuestro laboratorio, permite reducir el número de animales utilizados en los ensayos. Dos animales se inocularon con el virus tratado con 2D9 y otros dos con el virus incubado con 3A10. El grupo control se retó con la misma dosis de virus sin incubación previa con anticuerpos. Tras la inoculación se comprobó diariamente el estado general de los animales. La tasa de supervivencia de los animales a lo largo del ensayo se muestra en la **Figura 14**. Hasta las 48 horas tras la infección no se detectó signos de enfermedad en ninguno de los animales, pero, entre las 48 y 72 horas murió un animal del grupo control y otro del grupo infectado con el virus tratado con 3A10, alcanzándose en ambos casos el 50 % de supervivencia que se mantuvo hasta el final del experimento (168 horas tras la infección). Sin embargo, en el caso de los animales inoculados con el virus incubado con 2D9, la tasa de supervivencia fue del 100% durante todo el tiempo que duró el experimento.

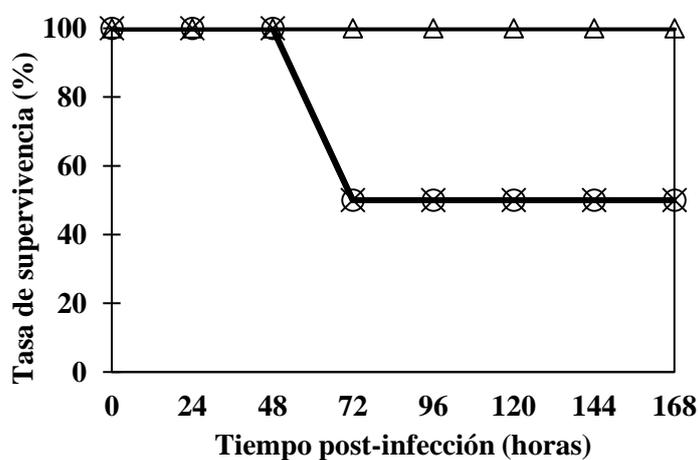


Figura 14. Análisis de supervivencia de conejos infectados experimentalmente con el virus RHDV-Gal08/13 incubado previamente con los anticuerpos monoclonales 2D9 (triángulos), 3A10 (círculos), o sin tratar con anticuerpos (cruces).

Con el objetivo de demostrar si el virus permanece en los animales una vez acabado el experimento (sacrificados) o muertos, se realizaron análisis RT-PCR para la cuantificación del número de copias de ARN viral en muestras de hígado de todos los animales. En la **Tabla 9** puede observarse que los dos animales que se infectaron con el virus tratado con 2D9 y que sobrevivieron a la infección, no tienen ARN viral detectable, lo que indica que además de la protección frente a la enfermedad la neutralización con este monoclonal evitó la infección y su posterior replicación. En el caso de los animales infectados con el virus tratado con 3A10 el animal superviviente no tenía material genético del virus detectable, mientras que el conejo que murió entre las 48 y 72 horas tras la infección tenía un título alto de copias de ARN viral ($2,1 \times 10^6$ copias ARN/mg hígado). En los 2 animales control, infectados con el virus sin neutralizar, se detectan copias virales de ARN pero, en el animal muerto se detectó en mayor cantidad ($7,65 \times 10^5$ copias ARN/mg hígado) que en el animal que sobrevivió ($2,55 \times 10^2$ copias ARN/mg hígado).

Tabla 9. Cuantificación de ARN viral en animales infectados con RHDV tratados con anticuerpos monoclonales.

Grupo experimental	Estado del animal	Ct*	Nº copias ARN viral
RHDVb+2D9	Superviviente	Indeterminado	0,00E+00
	Superviviente	Indeterminado	0,00E+00
RHDVb+3A10	Muerto (48-72 hpi)	17,56	2,10E+06
	Superviviente	Indeterminado	0,00E+00
RHDVb (Control)	Muerto (48-72 hpi)	19,15	7,65E+05
	Superviviente	31,74	2,55E+02

*Ct: ciclo umbral de PCR a tiempo real dónde se detecta presencia de ARN viral.

En un experimento previo, dónde todavía no se había estudiado la DL50 del virus RHDV-Gal08/13, se hizo un ensayo de neutralización con 2D9 y 3A10. En este caso la dosis de virus inyectada a los animales fue 100 veces mayor que la del experimento anteriormente expuesto, aunque la cantidad de anticuerpo empleado en el ensayo de neutralización fue la misma. Se utilizaron 2 gazapos por grupo, y las tasas de supervivencia obtenidas demostraron la neutralización del virus por 2D9, ya que los dos animales sobrevivieron hasta el final del experimento. Mientras que los dos animales del grupo infectado con virus tratado con 3A10 murieron entre las 24-48 horas tras la infección.

4.2.2. Localización de epítomos del anticuerpo monoclonal 2D9.

Una vez establecido que 2D9 reacciona con el dominio P de la proteína VP1 y que se trata de un anticuerpo neutralizante, se ha planteado el uso de herramientas *in silico* para buscar las regiones del dominio P dónde es más probable que ocurra la interacción con el anticuerpo. Para ello fue necesario la secuenciación de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de 2D9, realizado por la compañía *Absolute Antibody*. El resultado de la secuenciación se recoge en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Secuencias de ADN y aminoácidos del dominio variable del anticuerpo 2D9.

Secuencia ADN de la cadena ligera	Secuencia ADN de la cadena pesada
GAGCTCGTGATGACCCAGACTCCAGCC TCCCTATCTGTATCTGTGGGAGAACT GTCACCATCACATGTCGAGCGAGTGAC AATATTTATAGTAATTTAGCATGGTAT CAGCAGAAACAGGGAAAATCTCCTCA GCTCCTGGTCTTTGCTGCAACAACTT AGCAGATGGTGTGCCATCAAGGTTTCAG TGGCAGTGGATCAGGCACACAGTATTC CCTCAAGATCAACAGCCTGCAGTCTGA AGATTTTGGGAATTACTGTCAACA TTTTTGGGGTATTCCGTGGACGTTCCGGT GGGGGCACCAAGCTGGAACCTCAA	CAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAAC TGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCT CCTGCAAGGCTTCTGGATATACCTTCACAAA GTATGGACTGAACTGGGTGAGGCAGGCTCCA GGAAAGGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATA GACACCTACACTGGAGAGCCAACATATGCTG ATGACTTCAAGGGACGGTTTGCCTTCTCTTTG GAAACCTCTGCCAACACTGCCTATTTGCAGA TCAACTACCTCAAAGATGAGGACATGGCTAC ATATTTCTGTACAAGATATGATTACGGCGAG GGATCTGGGCCTCAATTTACTTACTGGGGCC AAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA
Secuencia de aminoácidos cadena ligera	Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada
ELVMTQTPASLSVSVGETVTITCRASDNI YSNLAWYQQKQKSPQLLVFAATNLAD GVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGN YYCQHFHWGIPWTFGGGKLELK	QIQLVQSGPELKKPGETVKISKASGYTFTKYG LNWVRQAPGKGLKWMGWIDTYTGEPTYADD FKGRFAFSLETSANTAYLQINYLKDEDMATYF CTRYDYGEGSGPQFTYWGQGLVTVSA

Utilizando la herramienta informática PIGS (Marcatili *et al.*, 2008), se ha obtenido un modelo de la fracción variable del anticuerpo 2D9 (**Figura 15**). A su vez, este análisis proporciona las secuencias que corresponden a regiones determinantes de complementariedad (CDR, complementarity determining region) dentro de cada una de las cadenas que forman el paratopo que se indican en la **Figura 15** con distintos colores. Como puede verse en el modelo de la fracción variable del anticuerpo 2D9 existen 6 CDR, tres de ellos pertenecen a la cadena pesada (CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3) y los otros tres a la cadena ligera (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3) (**Figura 15A**). Cuando en este modelo se representa la superficie de la molécula los CDR que sobresalen más parecen ser los CDR-H2, CDR-H3 y CDR-L1 (**Figura 15B**). En cuanto al potencial electrostático de la molécula, en la **Figura 15C** puede observarse como la mitad izquierda (cadena pesada) del paratopo es claramente electronegativa, en especial el CDR-H3. Esto podría

influir en la interacción con el epítipo del anticuerpo, puesto que las diferencias de carga electrostática afectan a la atracción entre distintas moléculas y átomos.

El *docking* o acoplamiento computacional es un proceso de predicción de la conformación de un complejo a partir de sus componentes por separado. En la actualidad, está emergiendo como una técnica *in silico* rápida y asequible para la caracterización estructural de complejos antígeno-anticuerpo.

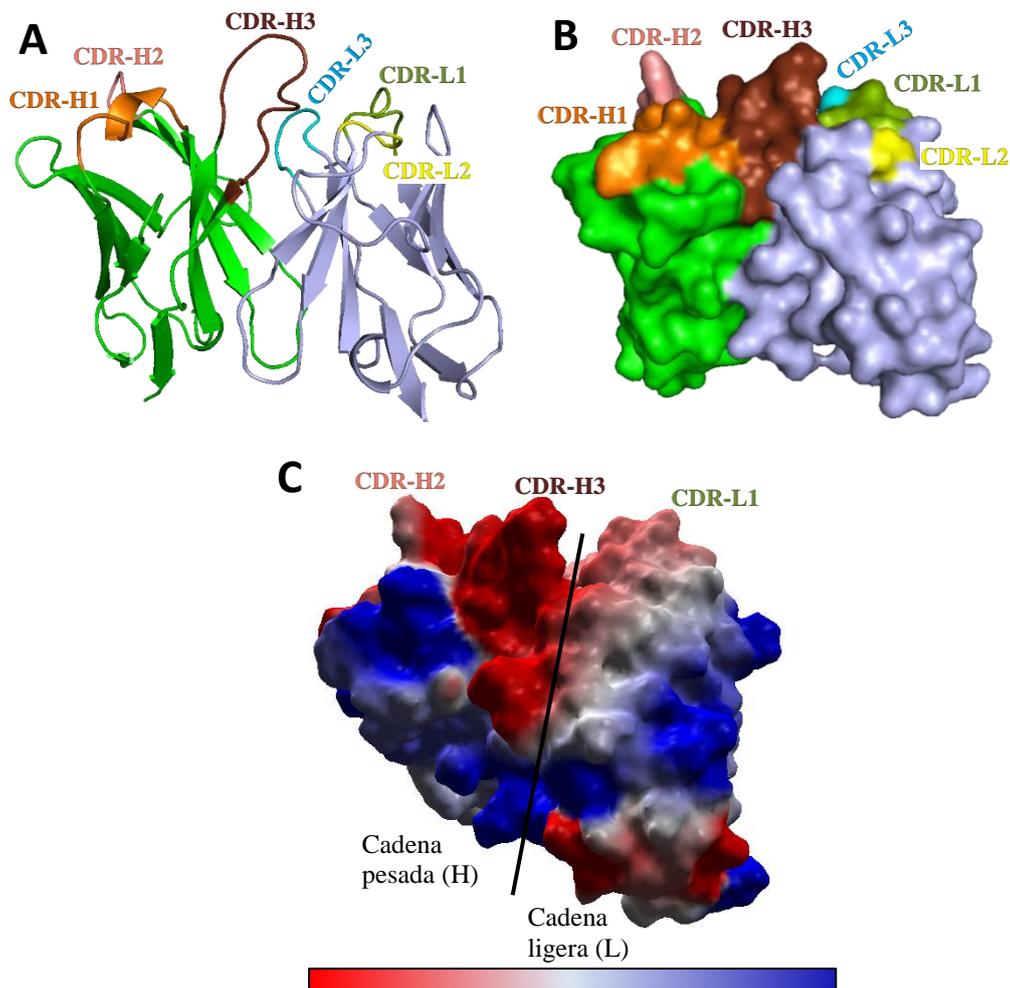


Figura 15. Modelo tridimensional de las regiones variables de 2D9. **A.** Representación de la estructura de las cadenas ligera (gris) y pesada (verde) incluyendo las distintas regiones de complementariedad que conforman el paratopo del anticuerpo 2D9. **B.** Imagen tridimensional de la superficie de la región variable de 2D9. **C.** Representación del potencial electrostático de la superficie del paratopo en el modelo generado para la fracción variable de 2D9.

La estructura cristalina del dominio P de VP1 de RHDV de la nueva variante (4X1W) (Leuthold *et al.*, 2015) se muestra en la **Figura 16A** se encuentra depositada y disponible en la base de datos *Protein Data Bank* (Gilliland *et al.*, 2000). Estudios estructurales anteriores (Wang *et al.*, 2013) ya mostraron que los principales determinantes antigénicos de la proteína VP1 se encontrarían en los lazos más externos del subdominio P2. Los cinco lazos expuestos del subdominio P2 de RHDVb se indican sobre su estructura cristalina en la **Figura 16A** y **Figura 16B**.

Mediante la plataforma online *ClusPro* se realizó una simulación de la interacción entre antígeno y anticuerpo utilizando la herramienta *Dock*. En primer lugar, se realizó la simulación empleando como antígeno un solo monómero del dominio P. En el modelo más probable de interacción obtenido, mostrado en la **Figura 16C**, el anticuerpo 2D9 sería capaz de unirse principalmente a 3 de los lazos pertenecientes al subdominio P2, concretamente a los lazos L1, L3 y L5. En el caso de la simulación empleando como antígeno un dímero del dominio P de VP1, el anticuerpo 2D9 sería capaz de interactuar con los mismos lazos del subdominio P2 pero con distinta disposición de dichos lazos dentro del paratopo como se observa en la **Figura 16D**.

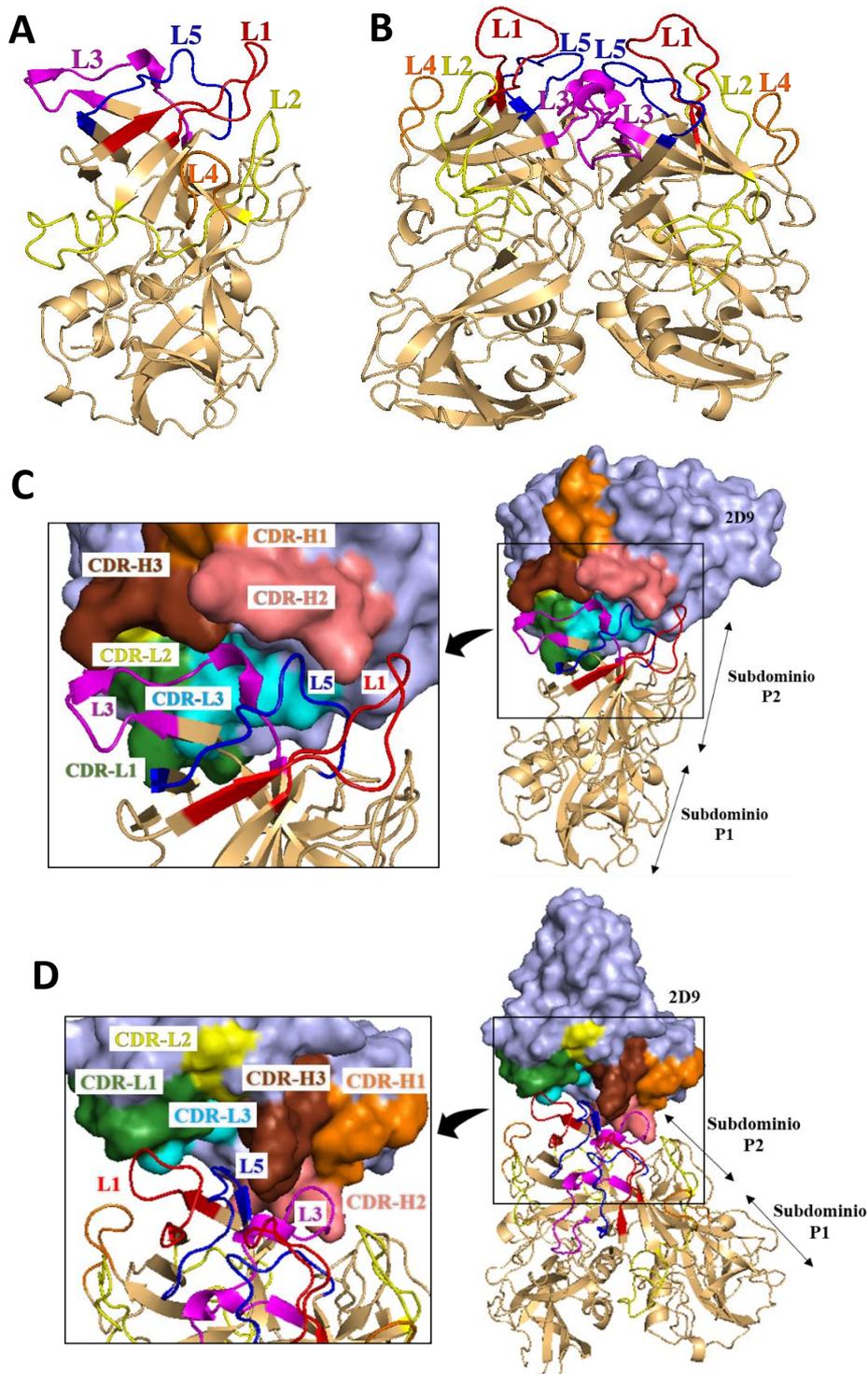


Figura 16. Modelos de interacción entre el dominio P de RHDV-Nav10/11 y el anticuerpo 2D9. **A.** Estructura tridimensional del monómero dominio P de RHDV-Nav10/11 (4X1W) mostrando los lazos del subdominio P2 más expuestos al exterior cuando se encuentra conformando la cápsida viral. **B.** Estructura tridimensional de un dímero del dominio P de RHDV-Nav10/11. **C.** Detalle del modelo más probable del complejo formado por un monómero del dominio P de RHDV-Nav10/11 y la representación superficial de la región variable del anticuerpo 2D9. **D.** Imagen del modelo más probable del complejo formado por un dímero del dominio P de RHDV-Nav10/11 y la representación superficial de la región variable del anticuerpo 2D9. En el recuadro se amplía la región de contacto entre el anticuerpo 2D9 y el dominio P.

A partir de los modelos obtenidos, y mediante un análisis en el programa PyMOL, se obtuvieron los posibles contactos polares que se establecen entre los lazos del subdominio P2 y los CDR de 2D9 que se muestran en las **Tablas 11 y 12**.

Tabla 11. Aminoácidos implicados en las interacciones polares entre el monómero del dominio P de RHDV-Nav10/11 y 2D9, deducidos de la simulación por *docking*.

2D9	Dominio P
Asp52 y Thr55 (CDR-H2)	Thr409 (L5)
Glu57 (CDR-H2)	Tyr304 y Ser309 (L1)
Tyr97 (CDR-H3)	Val370 y Thr371 (L3)
Asp27 (CDR-L1)	Ser422
Thr59	Gly406 (L5)

Tabla 12. Aminoácidos implicados en las interacciones polares entre el dímero del dominio P de RHDV-Nav10/11 y 2D9, deducidos de la simulación por *docking*.

2D9	Dominio P	
Thr55 y Glu57 (CDR-H2)	Arg299	
Glu99 (CDR-H3)	Thr371 (L3) y Thr409 (L5)	
Gly98 (CDR-H3)	Gln413 (L5)	Monómero 1
Tyr97 (CDR-H3)	Ser363 (L3) y Thr415 (L5)	
Asn32 (CDR-L1)	Tyr304 (L1) y Asn412 (L5)	
Tyr54 (CDR-H2)	Thr481	Monómero 2

Como puede observarse en la **Tabla 11**, la interacción del monómero del dominio P con 2D9 se produciría principalmente por contactos polares entre los lazos 1 y 5 del dominio P con CDR-H2, el lazo 3 con CDR-H3 y el residuo de serina en la posición 422, que no pertenece a ningún lazo, con CDR-L1. Además, existiría un contacto entre un aminoácido del lazo 5 (Gly406) con un residuo del anticuerpo que no pertenece a ninguna región CDR.

Por otro lado, cuando se estudió la interacción entre el dímero del dominio P y 2D9 (**Tabla 12**) los lazos 3 y 5 interaccionarían en distintas posiciones con CDR-H3 del paratopo de 2D9, los lazos 1 y 5 lo harían con CDR-L1 de 2D9 y el residuo Arg299 del

dominio P, situado fuera de los lazos más externos, se uniría al CDR-H2 del paratopo. Estas interacciones se producirían entre uno de los monómeros y el monoclonal, pero, además parece existir un contacto entre el CDR-H2 del anticuerpo y un residuo del otro monómero del dominio P (Thr481) que se encuentra fuera de las secuencias de los lazos externos del subdominio P2.

Para demostrar experimentalmente que los lazos más externos del subdominio P2 interaccionan, o de alguna forma influyen en la unión a 2D9, se diseñaron péptidos sintéticos que contienen las secuencias de los cinco lazos por separado (**Tabla 13**). Después, se puso a punto un protocolo de ELISA de competición para estudiar la interacción de uno o varios de esos péptidos con el anticuerpo 2D9, y así, determinar si existe inhibición de la unión de 2D9 a las VLPs de RHDV-Nav10/11 en presencia de dichos péptidos.

Tabla 13. Secuencia y localización de los péptidos sintéticos correspondientes a los 5 lazos del subdominio P2 de la VP1 de RHDV-Nav10/11.

Nombre del péptido	Secuencia	Localización en VP1	Tamaño (aminoácidos)
NL15	NASYPGSSSSNVLEL	301-315 (lazo 1)	15
SA34	SAGSAADNPISQIAPDGFDPMSFVPFSGTTVPTA	319-352 (lazo 2)	34
WA15	WNSSNGAPFVTTVQA	361-375 (lazo 3)	15
TQ8	TGAPSNPQ	382-389 (lazo 4)	8
IA13	IYGVATGINQATA	404-416 (lazo 5)	13

En los ELISA de competición los péptidos sintéticos se utilizaron por separado en cantidades equimolares, desde 10 nmoles/pocillo en diluciones seriadas en base 10 hasta 0,1 pmoles/pocillo. En la mezcla de péptidos se añadió la misma cantidad que se utilizó de cada uno de ellos por separado. Los resultados de densidad óptica se normalizaron siguiendo la recomendación de Sánchez *et al.*, (2002) para expresarlos en porcentajes respecto del control positivo y corrigiendo con la media del control negativo (no contenía VLPs tapizando el pocillo). Los resultados obtenidos se expresaron en porcentaje de reducción de la señal de 2D9 con respecto al control positivo en ausencia de péptidos sintéticos (**Tabla 14**). A diferencia de lo que cabía esperar la capacidad de inhibición de la interacción entre 2D9 y VLPs es menor cuando se emplea mayor cantidad de péptido por pocillo (en nuestro caso 10 nmoles/pocillo). El mismo fenómeno se observa con la

mezcla de todos los péptidos dónde la cantidad total de péptido es 5 veces mayor por pocillo y el porcentaje de inhibición es significativamente menor que en el caso de cada uno de los péptidos por separado. Curiosamente, cuando se emplearon mezclas de 10 nmoles/pocillo de cada péptido, se obtuvieron valores de densidad óptica superiores a las obtenidas en el control positivo (no hay presencia de péptidos), por lo tanto, cuando se expresa en valores de inhibición, el resultado son valores negativos que reflejan un aparente aumento de la interacción de 2D9 con las VLPs en presencia de la mezcla de péptidos.

Tabla 14. Porcentajes de inhibición de la interacción de 2D9 con VLPs de RHDV-Nav10/11 medidos por ELISA en presencia de péptidos sintéticos.

	NL15 (L1)	SA34 (L2)	WA15 (L3)	TQ8 (L4)	IA13 (L5)	Mezcla peptídica
nmoles péptido/pocillo	% Reducción OD (Media±SD)*					
10	-0,62±0,02	2,08±0,04	3,47±0,04	2,48±0,01	5,82±0,02	-4,29±0,34
1	4,92±0,18	8,10±0,03	6,75±0,12	8,92±0,05	11,22±0,32	2,17±0,14
0,1	8,96±0,47	12,11±0,09	10,84±0,11	9,52±0,37	12,82±0,26	3,43±0,14
0,01	8,04±0,08	8,88±0,13	8,45±0,01	9,39±0,18	10,51±0,28	1,28±0,002
0,001	11,43±0,23	10,38±0,30	10,76±0,23	10,02±0,16	13,82±1,13	3,82±0,14
0,0001	9,60±0,22	12,06±0,14	11,29±0,05	11,04±0,003	12,86±0,73	3,05±0,15

*Media y SD de las 2 réplicas realizadas para cada péptido y cantidad.

Posteriormente, se hicieron las medias para cada péptido y de todas las cantidades probadas, para poder hacer un análisis estadístico y comprobar la variación de las señales obtenidas en presencia del péptido con respecto al control positivo que se considera el valor 100 %. La gráfica que representa dichas medias y desviaciones se muestra en la **Figura 17**. Como puede observarse en presencia de la mezcla de péptidos (Mix) la media obtenida no es diferente a la del control positivo. Sin embargo, en presencia de los péptidos por separado NL15 (L1), SA34 (L2), WA15 (L3), TQ8 (L4) o IA13 (L5), la señal se reduce significativamente en todos los casos ($p < 0,05$), aunque con los péptidos TQ8 (L4) e IA13 (L5) con mayor significación que el resto ($p \leq 0,001$).

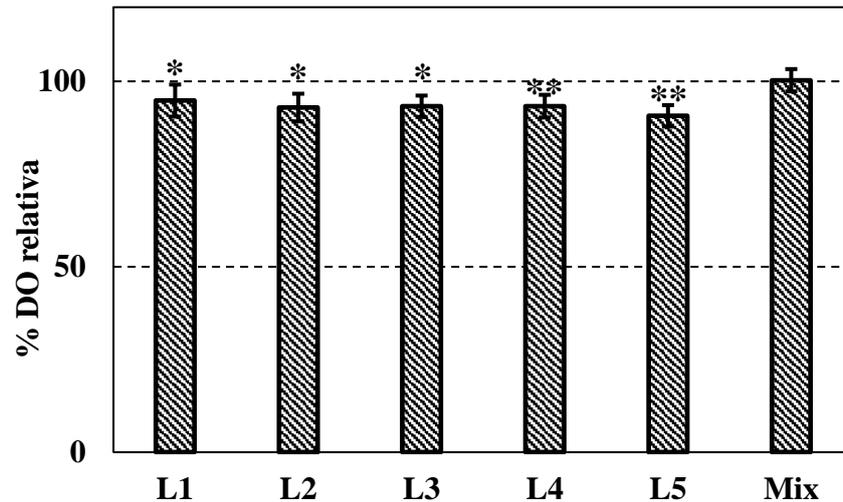


Figura 17. Porcentaje de la densidad óptica relativa obtenida en ELISA derivada de la interacción de 2D9 con VLPs de RHDV-Nav10/11 en presencia de péptidos sintéticos correspondientes a los lazos del subdominio P2. El valor de 100 % corresponde al control en ausencia de péptidos. *Valor significativamente menor que el control positivo con $p < 0,05$; **Valor significativamente menor que el control positivo con $p \leq 0,001$.

4.2.3. Diseño de dominios P mutantes basados en secuencias de aislados naturales mutantes de RHDVb

En nuestro laboratorio se caracterizaron aislados naturales mutantes de RHDV de la nueva variante que no eran identificados por el anticuerpo 2D9 (Dalton *et al.*, 2017). Cuando se realizaron alineamientos de las secuencias parciales de estos aislados con las de RHDV-Nav10/11 y RHDV-Ast89 se observó que contenían cambios en la secuencia que codifica la proteína VP1 (**Figura 18A**). Dado que el epítipo de 2D9 se encuentra dentro del dominio P de VP1, el análisis se centró en las mutaciones presentes en esta región.

En el análisis de secuencias se observó que el aislado nombrado como RHDV-Ger06/12-2 contenía un solo cambio en la secuencia que codifica la proteína VP1 en el residuo número 387 (dentro del lazo 4 del subdominio P2), donde una asparagina es sustituida por un residuo de ácido aspártico. Basándose en la secuencia de este aislado mutante silvestre se generaron dos mutantes puntuales de la secuencia del dominio P de RHDV-Nav10/11. Uno de ellos contiene la misma mutación del aislado natural y otro contiene el residuo sustituido por una alanina y se nombraron como N387D y N387A, respectivamente (**Figura 18B**).

Por otro lado, observando el alineamiento de secuencias de RHDV-Nav10/11, RHDV-Ast89 y otro aislado natural mutante (RHDV-Ler11/16-1), se comprueba que contiene varias mutaciones con respecto a la nueva variante a lo largo de la secuencia. Una de las regiones con cambios importantes se encuentra dentro del lazo 5 y coincide con residuos distintos también en RHDV-G1. Por tanto, se seleccionaron las posiciones 414 y 415 de la proteína VP1 para realizar un mutante en la secuencia del dominio P de RHDV-Nav10/11 que contiene los residuos correspondientes a RHDV-Ast89 (**Figura 18B**). El mutante obtenido se nombró como AT414-15. Hay que indicar que el mutante natural RHDV-Ler11/16-1 también tiene una mutación con respecto a RHDV-Nav10/11 en el lazo 4 (que también presenta cambios en RHDV-Ast89).

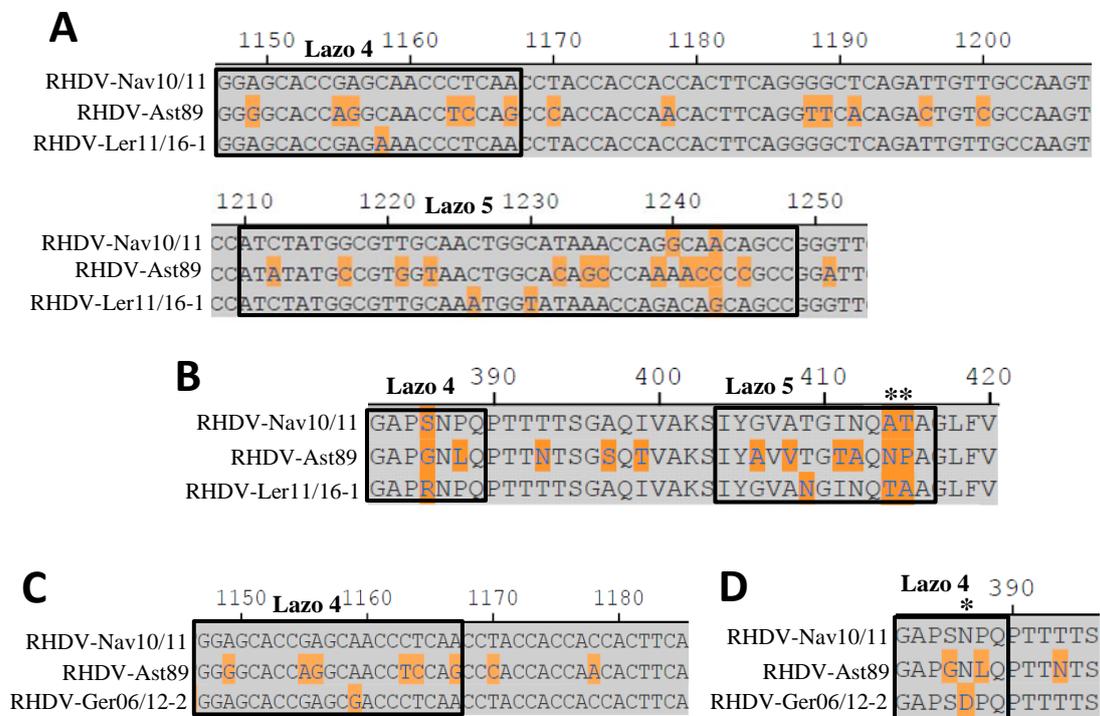


Figura 18. Análisis de secuencias de la proteína VP1 de aislados silvestres y mutantes de RHDVb. Alineamientos parciales de secuencias de ADN (A) y aminoácidos (B) de la zona relevante de VP1 en el aislado salvaje RHDV-Ler11/16-1 con respecto a RHDV-Nav10/11 y RHDV-Ast89. Alineamientos parciales de secuencias de ADN (C) y aminoácidos (D) de la región relevante de VP1 en el aislado salvaje RHDV-Ger06/12-2 con respecto a RHDV-Nav10/11 y RHDV-Ast89. Los residuos nucleotídicos o aminoácidos diferentes aparecen sombreados en naranja. Las posiciones indicadas en gris se refieren a la secuencia de VP1.

Los fragmentos de ADN sintéticos (suministrados por IDT) con los cambios correspondientes a los mutantes descritos, con un tamaño de 954 pb se diseñaron para poder insertarlos dentro de la secuencia original del dominio P de RHDV-Nav10/11, entre

el sitio de restricción PstI (en posición 111) y NotI (al final del dominio P). Los fragmentos se amplificaron por PCR utilizando la polimerasa LATaq para aumentar la cantidad disponible. Una vez purificados se cortaron con los enzimas de restricción Pst I y Not I y se ligaron individualmente al plásmido pMalc2X-DomPN11opt, previamente digerido con los mismos enzimas de restricción.

Las secuencias de los mutantes obtenidos se analizaron mediante alineamientos con la secuencia original del dominio P de RHDV-Nav10/11 (**Figura 19A**). Por otro lado, se estudió *in silico* mediante el programa PyMOL la posición donde se encontraban las mutaciones dentro del dominio P para comprobar si se localizaban en la región de interacción entre el monoclonal 2D9 y su epítipo (**Figuras 19B y 19C**). El modelo tridimensional de la interacción entre un monómero de dominio P y el monoclonal 2D9 se muestra en la **Figura 19B**, donde puede observarse que aparentemente los aminoácidos mutados en los mutantes N387A y N387D o AT414-415, no tienen un contacto directo con el paratopo del monoclonal 2D9. Sin embargo, en el modelo de interacción del dímero del dominio P con el anticuerpo (**Figura 19C**), los residuos en posición 387 siguen quedando lejos de la región de interacción, pero los aminoácidos en posiciones 414 y 415 se encuentran cerca del paratopo de 2D9.

Los dominios P mutantes se clonaron dentro del vector de expresión pMal-c2X modificado, y se expresan con una cola de histidinas añadida en el extremo amino y la proteína MBP en el extremo carboxilo. Una vez purificados se estudió la interacción de estos dominios mutantes con el anticuerpo 2D9, mediante Dot blot empleando como controles positivos VLPs y dominio P de RHDV-Nav10/11 (**Figura 20A**). Los resultados indican que 2D9 mantiene la interacción con los dominios P N387A y AT414-15, pero parece no ser capaz de unirse al dominio P N387D. Esto indicaría que el cambio puntual del aminoácido asparagina (en RHDV-Nav10/11) de la posición 387 por un ácido aspártico (N387D) afecta a la interacción de 2D9 y, además, este cambio realizado en la misma posición, pero por un aminoácido como alanina (N387A), no afecta a la unión del monoclonal al dominio P.

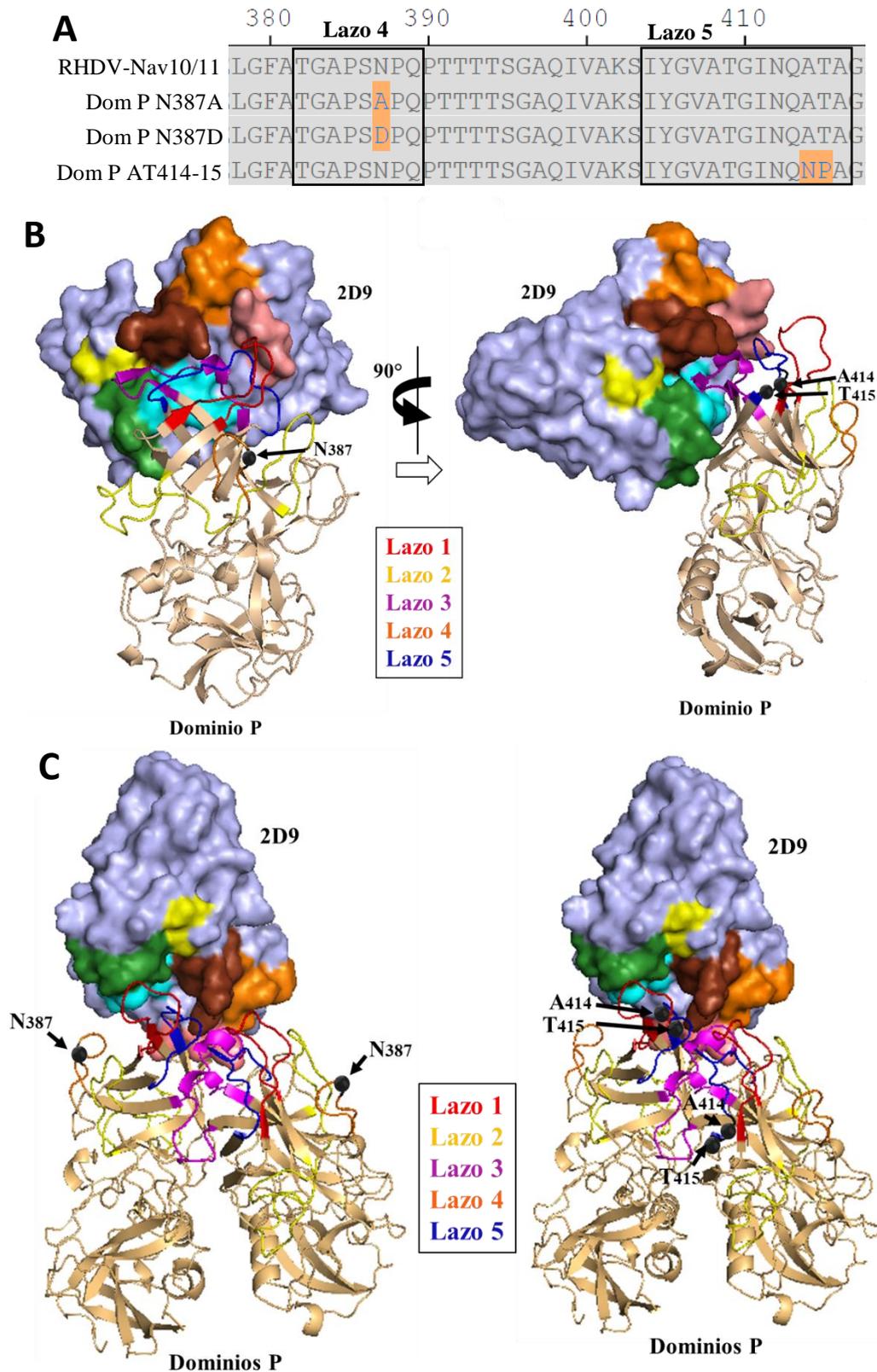


Figura 19. Análisis de las secuencias y modelos tridimensionales de los mutantes del dominio P. **A.** Alineamiento de la secuencia del dominio P de los distintos mutantes (N387A, N387D y AT414-15), respecto a la proteína VP1 de RHDV-Nav10/11. **B.** Modelos tridimensional de la interacción entre un monómero de dominio P y 2D9. **C.** Modelo tridimensional de interacción entre un dímero de dominio P y 2D9. Los círculos negros indican las posiciones dónde se encuentran los residuos mutados de N387A, N387D o AT414-15.

Con el fin de estudiar preliminarmente si las mutaciones afectan a la capacidad del dominio P para formar dímeros se realizaron electroforesis de estos dominios mutantes, tanto en condiciones desnaturalizantes como en condiciones nativas. Los resultados mostrados en la **Figura 20B** muestran que los tres tipos de dominios P mutantes mantienen la capacidad de formar dímeros, ya que en todos se observa la banda de proteína correspondiente al monómero de la fusión del dominio P (~85 kDa) y una banda de tamaño superior, al igual que ocurre en las construcciones con los dominios P de RHDV-Nav10/11 y RHDV- Ast89.

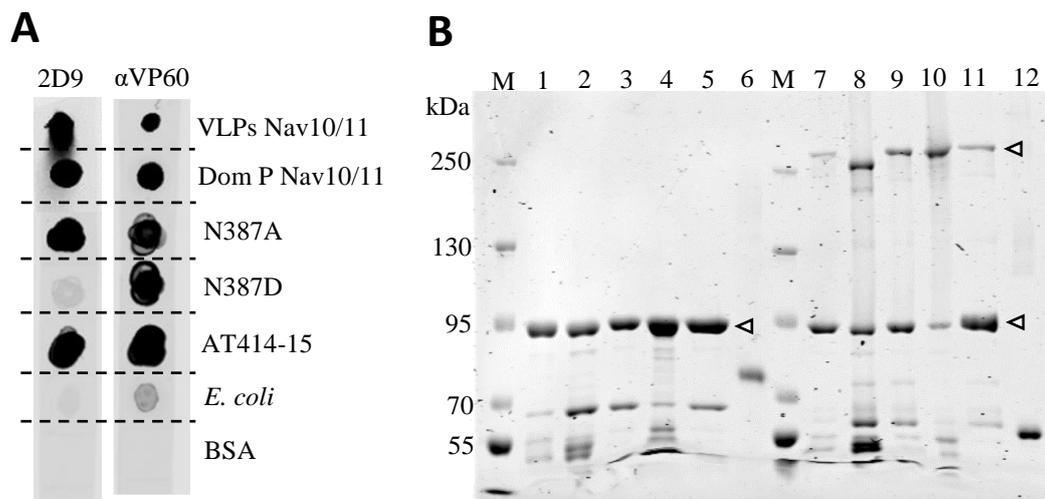


Figura 20. Estudio de interacción en Dot blot (**A**) y dimerización mediante electroforesis (**B**) nativas (7-11) o desnaturalizantes (1-5) de los mutantes puntuales del dominio P. Dominio P RHDV-Nav10/11 (1 y 7), dominio P de RHDV-Ast89 (2 y 8), dominio P N387A (3 y 9), dominio P N387D (4 y 10), dominio AT414-15 (5 y 11) y BSA (6 y 12). Las puntas de flecha indican las bandas correspondientes a los dominios P (monómeros y dímeros).

Para comprobar de una forma más cuantitativa los resultados de reactividad de estos mutantes frente al monoclonal 2D9 se realizó un ELISA indirecto, utilizando como antígenos que tapizan la placa las distintas construcciones mutantes (fusiones con MBP y cola de histidinas): dominio P N387A, dominio P N387D y dominio P AT414-15. Como controles positivo y negativo se emplearon las construcciones del dominio P de RHDV Nav10/11 y de RHDV-Ast89, respectivamente. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 21**, dónde se puede observar como la señal obtenida frente a 2D9 en los tres mutantes estudiados se reducen significativamente con respecto al dominio P de RHDV-Nav10/11 y, proporcionalmente igual en las distintas cantidades de antígenos probadas. El mutante N387D muestra una interacción similar a la obtenida en el control negativo y,

por tanto, se encuentra por debajo del punto de corte del ELISA. Esto demuestra, al igual que los resultados por Dot blot (**Figura 20A**), que la sustitución del residuo de asparagina en posición 387 por un aspartato provoca que el monoclonal pierda la capacidad de unión al dominio P. Aunque los tres mutantes ven afectadas la interacción con 2D9, es con el mutante N387A dónde se reduce en menor proporción la capacidad de interacción de 2D9. La mutación de los residuos de la posición 414 y 415 (mutante AT414-15) también afecta a la unión de 2D9 con su epítipo como muestran los resultados, reduciéndose la señal más que en el caso del mutante N387A.

Cuando los resultados de densidad óptica se normalizaron según Sánchez *et al.*, 2002, se obtuvieron los porcentajes de densidad óptica relativos con respecto al control de dominio P RHDV-Nav10/11 de cada uno de los mutantes analizados. Los resultados obtenidos y los valores p del análisis estadístico, se muestran en la **Tabla 15**, dónde puede observarse con un p valor menor o igual a 0,001 que, en todos los casos, la disminución de la señal de interacción de 2D9 con cada uno de los mutantes y cantidades probadas es significativa con respecto al control positivo del dominio P original. Además, se demuestra, al igual que en las **Figuras 20** y **21**, la interacción del anticuerpo 2D9 con el mutante N387D se reduce de forma muy intensa y queda en valores cercanos a 0 o incluso menores.

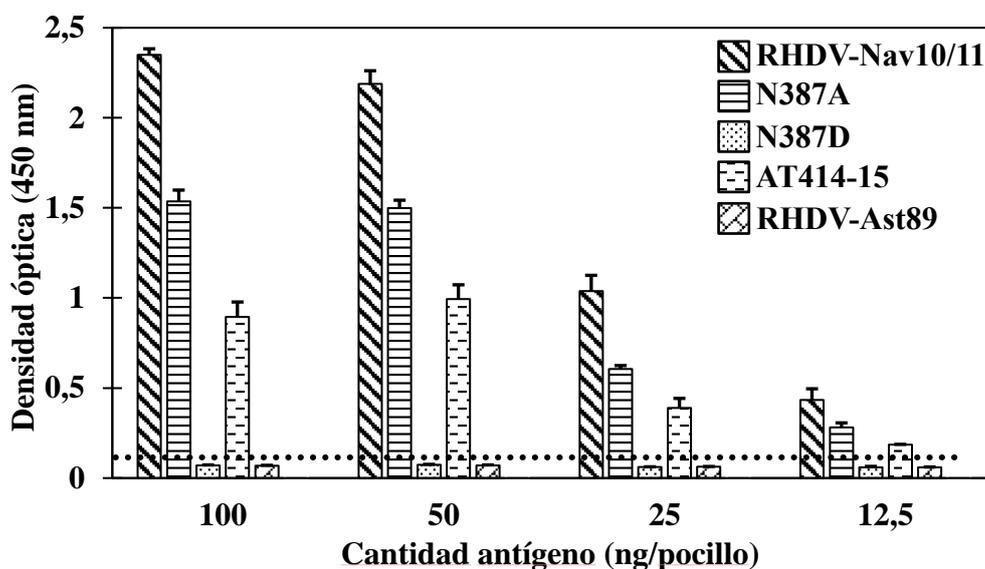


Figura 21. Análisis de interacción mediante ELISA indirecto de los mutantes puntuales del dominio P con 2D9. Se representan la media y desviación estándar de la densidad óptica obtenida de cada mutante analizado por triplicado. La línea de puntos muestra el valor de punto de corte del ELISA.

Tabla 15. Interacción del anticuerpo 2D9 con los mutantes puntuales de dominio P expresada en porcentajes de densidad óptica relativa con respecto al control positivo en ensayos de ELISA.

Mutante de dominio P	Cantidad de fusión de dominio P (ng/pocillo)			
	100	50	25	12,5
N387A	64,31±2,79 ^a	62,68±1,95	23,51±0,87	9,35±1,08
N387D	0,06±0,13	0,24±0,08	-0,03±0,06	-0,39±0,21
AT414-15	36,24±3,61	40,53±3,51	14,03±2,36	5,08±0,12

Resultados se muestran en forma de media±SD. Los valores p obtenidos en la comparación de los %DO relativa frente al control positivo (dominio P de RHDV-Nav10/11) son en todos los casos $p < 0,001$, salvo: ^a $p = 0,001$.

Cuando se realizó la comparación de los porcentajes de DO relativa mostrados en la **Tabla 15**, mediante un test post hoc de Dunn para observar diferencias significativas entre los distintos mutantes puntuales, se obtuvo que las diferencias entre los mutantes N387A y N387D eran significativas a las cantidades de 100 y 25 ng/pocillo con $p = 0,026$ y $p = 0,042$, respectivamente.

4.2.4. Estudio de la reactividad con 2D9 de mutantes de lazos del dominio P de RHDV-Nav10/11

Para intentar mapear las regiones del dominio P que interaccionan con el monoclonal 2D9, se realizaron distintos mutantes partiendo de la secuencia original optimizada del dominio P de RHDV-Nav10/11. Las mutaciones consistieron en sustituir las secuencias de cada uno de los lazos (L1 al L5) del subdominio P2 de Nav10/11 por las del aislado de RHDV-Ast89 clásico que no reacciona con 2D9. Las secuencias de cada lazo se mutaron de forma individual y también haciendo distintas combinaciones, cambiando varios lazos a la vez, que se esperaba afectasen a la interacción con 2D9. Se realizaron el mínimo número de cambios en la secuencia de ADN del dominio P de RHDV-Nav10/11 para modificar los codones que codifican cada aminoácido mutado. Las secuencias del dominio P obtenidas de los mutantes realizados se alinearon con las de RHDV-Nav10/11 y RHDV-Ast89, tanto de ADN (**Figura S1**, en Anexo) como de proteína (**Figura S2**, en Anexo), para comprobar que el resto del dominio conservaba la secuencia de RHDV-Nav10/11.

Los residuos aminoácidos sustituidos en cada lazo y sus posiciones dentro de VP1 se especifican en los alineamientos de la **Figura 22**. En la misma figura se muestran los modelos tridimensionales obtenidos con el programa PyMOL utilizando su herramienta de mutagénesis para modificar residuos aminoacídicos sobre la secuencia de RHDV-Nav10/11. Como puede observarse, en el lazo 1 (Ser301-Phe315, en color rojo), se sustituyen un total de 7 residuos aminoacídicos. En el lazo 2 (Asn319-Ala352, en amarillo), se cambian 8 aminoácidos. Un total de 3 residuos son los que se sustituyen en el caso del mutante del lazo 3 (Trp361-Ala375, en violeta). En el caso del lazo 4 (Thr382-Gln389, en color naranja) se introdujeron sólo dos cambios en la secuencia. El lazo 5 (Ile404-Ala416) contiene un total de 6 sustituciones. En consecuencia, los mutantes de dominio P que contienen varios lazos sustituidos contendrán la suma de los cambios de cada lazo. El mutante L1L4 tiene un total de 9 residuos sustituidos, en el caso de L4L5 serán 8 los aminoácidos cambiados y en el triple mutante L1L4L5 hay 15 residuos que difieren con respecto al dominio P de RHDV-Nav10/11.

Una vez realizadas las mutaciones sobre la secuencia del dominio P de RHDV-Nav10/11 optimizado para su expresión en *E. coli*, se clonaron en el vector pMal-c2X modificado, dónde se expresaron en forma de fusión con la proteína MBP y una cola de 6 histidinas (His tag, o 6xHis). Las proteínas de fusión de los distintos dominios de RHDV-Nav10/11, RHDV-Ast89 y las versiones mutantes se expresaron en la cepa BL21 de *E. coli* y, tras su inducción con IPTG, se purificaron. Finalmente, se analizaron mediante electroforesis en SDS-PAGE y tras la tinción con Coomassie del gel, se cuantificaron mediante el análisis de imagen en el software *Image Studio*.

Para comprobar si estos dominios P mutantes mantenían la capacidad de formar dímeros se analizaron en condiciones nativas mediante electroforesis (**Figura 23A**) y Western blot empleando un anticuerpo anti-His tag (**Figura 23B**). En los resultados de la electroforesis puede observarse como, en todos los casos, aparece una banda de aproximadamente 85 kDa, correspondiente al monómero del dominio P fusionado con MBP y cola de histidinas, y una banda de tamaño superior (cabezas de flechas). Además, en el análisis por Western blot se comprueba que esas dos bandas contienen la fusión, puesto que son detectadas con el anticuerpo frente a cola de histidinas.

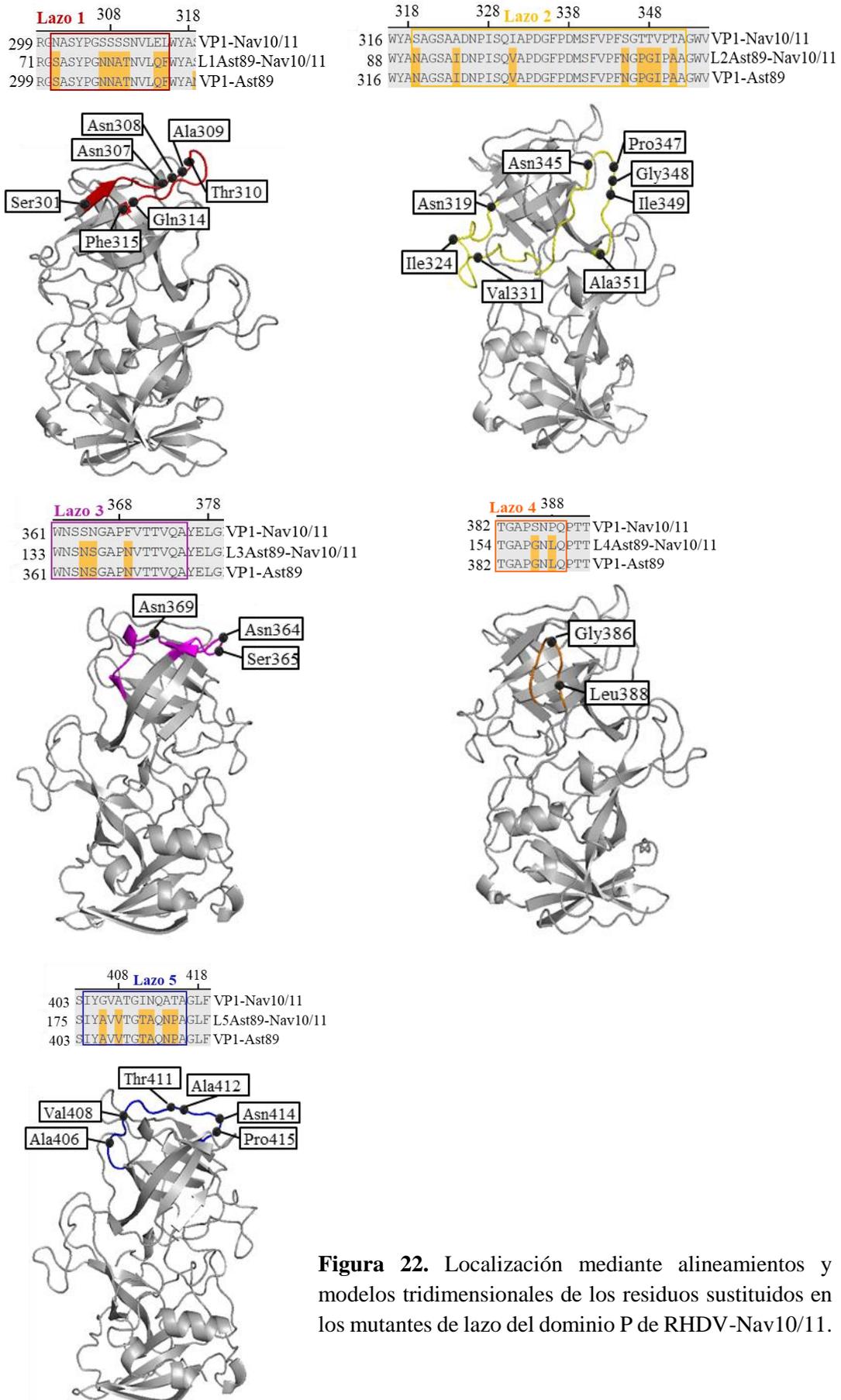


Figura 22. Localización mediante alineamientos y modelos tridimensionales de los residuos sustituidos en los mutantes de lazo del dominio P de RHDV-Nav10/11.

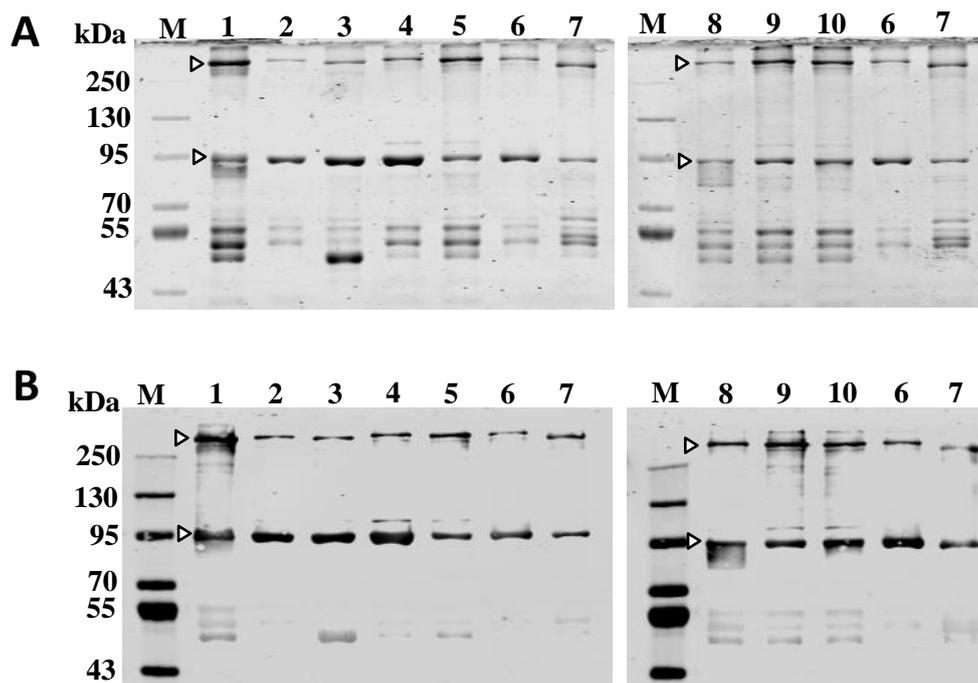


Figura 23. Estudio de dimerización de los mutantes de lazo del dominio P de RHDV-Nav10/11. **A.** Electroforesis en condiciones nativas. **B.** Análisis en condiciones nativas por Western blot utilizando el anticuerpo primario anti-His tag. Dominios P mutantes de L1 (1), L2 (2), L3 (3), L4 (4), L5 (5), L1L4 (8), L4L5 (9) y L1L4L5 (10). Dominios P de RHDV-Nav10/11 (6) y RHDV-Ast89 (7). Las puntas de flecha indican las bandas correspondientes a los dominios P (monómeros y dímeros).

Para analizar la reacción de los distintos dominios mutantes con el monoclonal 2D9 se realizó un ELISA indirecto tapizando la placa con las distintas construcciones de dominios P fusionados con MBP y cola de histidinas, en distintas cantidades. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 24**. Como control positivo se incluyó en cada placa de ELISA la construcción original del dominio P de RHDV-Nav10/11, y se utilizó el dominio P de RHDV-Ast89 como control negativo.

En la **Figura 24** puede observarse cómo en todos los dominios P de Nav10/11 en los que se ha sustituido uno o varios lazos por sus equivalentes en Ast89 se reduce la capacidad de interacción con 2D9. En algunos casos, como el mutante del lazo 5 (L5), el doble mutante (L4L5) y el triple mutante (L1L4L5), a todas las cantidades probadas, los valores obtenidos de señal frente a 2D9 son similares al punto de corte de la técnica y al control negativo con dominio P de Ast89. Por lo que se deduce que el cambio realizado, especialmente, del lazo 5 provoca una drástica pérdida de interacción con 2D9.

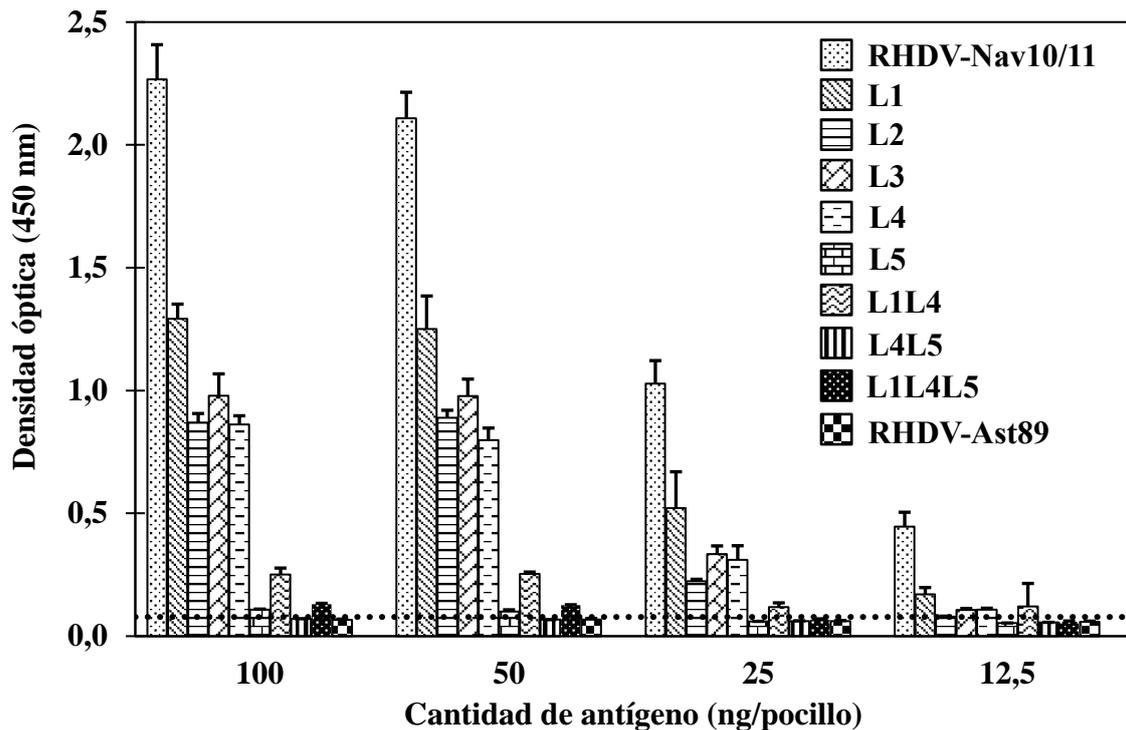


Figura 24. Análisis mediante ELISA de la interacción entre 2D9 y los mutantes de lazo del dominio P de RHDV-Nav10/11. Se representan la media y desviación estándar de la densidad óptica obtenida con cada mutante analizado por triplicado. La línea de puntos muestra el valor de punto de corte del ELISA.

Los resultados de densidad óptica obtenidos se normalizaron y corrigieron según Sánchez *et al.*, 2002, y se obtuvieron los porcentajes de densidad óptica relativa con respecto al control de dominio P RHDV-Nav10/11 (**Tabla 16**). En el análisis puede que, en todos los casos, la disminución de la señal con respecto al control positivo es significativa con un p valor $<0,05$.

Posteriormente, se realizó un análisis estadístico para determinar si existían diferencias significativas en el porcentaje en que se reduce la señal de 2D9 entre los distintos mutantes del dominio P. Con respecto a los mutantes simples, donde las mutaciones solo se realizaron sobre un lazo del dominio P, se observaron diferencias significativas entre el mutante L1 y L5 para todas las cantidades de antígeno, 12,5 ng/pocillo ($p=0,02$), 25, 50 o 100 ng/pocillo ($p=0,0087$). Con respecto a los dobles mutantes, L1L4 y L4L5, y el triple mutante L1L4L5, aplicando un test post hoc de Dunn no se obtuvieron diferencias significativas entre ellos. Cabe puntualizar que, puesto que estos análisis se aplicaron a datos obtenidos en ensayos ELISAs realizados de forma independiente, no puede hacerse

una correcta comparación estadística entre los mutantes simples y los mutantes dobles y triple. A pesar de ello, se puede observar en la **Tabla 16** que los dobles y triple mutantes de lazo reducen la señal frente a 2D9 más intensamente que algunos de los mutantes de un solo lazo. La acumulación de mutaciones en los dominios P con varios lazos mutantes parece incrementar la pérdida de unión del anticuerpo 2D9 cuando se compara con los mutantes del dominio con un solo lazo mutado. Además, esta reducción es más drástica si uno de los lazos sustituidos es el lazo 5, como ocurre en el doble mutante L4L5 y el triple mutante L1L4L5.

Tabla 16. Análisis ELISA de la interacción del anticuerpo 2D9 con los mutantes de lazo del dominio P expresada en porcentajes de densidad óptica relativa con respecto al control positivo.

Mutante de dominio P	Cantidad de fusión de dominio P (ng/pocillo)			
	100	50	25	12,5
L1	57,88±2,84	60,41±6,84	48,19±15,46 ^c	28,28±6,77 ^a
L2	37,99±1,73	41,94±1,59	17,22±0,83	5,47±0,53
L3	43,11±4,23	46,48±3,52	28,77±3,45	12,16±1,66
L4	37,63±1,66	37,34±2,50	26,29±6,00 ^a	12,66±1,40
L5	2,11±0,08	1,76±0,36	0,16±0,07	-1,02±0,09
L1L4	8,83±1,23	9,57±0,38	6,29±1,76	2,23±0,01 ^b
L4L5	0,06±0,04	-0,08±0,01	-0,34±0,06	-0,57±0,03
L1L4L5	2,68±0,17	2,49±0,10	-0,13±0,20	-0,44±0,13

Los p valores obtenidos en la comparación de los %DO relativa frente al control positivo (dominio P de RHDV-Nav10/11) son todos de $p < 0,001$, salvo: ^a $p = 0,001$; ^b $p = 0,012$; ^c $p = 0,014$.

De forma complementaria al estudio de la interacción del anticuerpo monoclonal 2D9 con estos dominios P mutantes, se esperaba realizar un ensayo de la capacidad de hemaglutinación de glóbulos rojos de estos dominios mutantes considerando las diferencias hemaglutinantes presentes entre los aislados RHDV-Ast89 y RHDV-Nav10/11 (Dalton *et al.*, 2012). Además, otros trabajos previos habían demostrado que el dominio P es la región de la proteína VP1 que contiene los sitios de unión a HBGAs (Leuthold *et al.*, 2015). Esto planteaba la posibilidad de determinar si los lazos que se habían sustituido en los mutantes generados contenían esas regiones de unión a HBGAs. Sin embargo, en las pruebas de hemaglutinación realizadas con las fusiones de dominios P originales de los aislados RHDV-Nav10/11 y RHDV-Ast89 se comprobó que no son capaces de hemaglutinar (datos no mostrados), a diferencia de las VLPs de los mismos

aislados. Dados estos resultados no fue posible continuar con la determinación de posibles sitios de unión del dominio P del virus a los HBGAs.

4.2.5. Desarrollo de nuevas herramientas diagnósticas para la detección de RHDVb

La nueva variante del virus RHDV se ha expandido por la península Ibérica, dónde ya no se aíslan brotes de RHDV clásico (Calvete *et al.*, 2014; Lopes *et al.*, 2015a). Además, recientemente se han descrito brotes de virus recombinantes cuyos genomas contienen la secuencia de VP1 de RHDVb a continuación de las secuencias no estructurales de genomas de RHDV-G1 o virus no patogénicos (G1/RHDVb o np/RHDVb) (Lopes *et al.*, 2015b). Por esto ha surgido la necesidad de disponer de herramientas diagnósticas que permitan la detección de RHDVb específicamente y ayuden al seguimiento y control de la enfermedad.

Como se ha mostrado en el apartado anterior, se obtuvieron anticuerpos monoclonales frente a distintos tipos de VLPs que muestran diferentes especificidades con respecto al tipo de RHDV que se considere. Concretamente, centramos el trabajo sobre dos anticuerpos monoclonales que pueden tener aplicaciones diagnósticas importantes: 3A10 que mostró reacción frente a virus clásico y nueva variante, y 2D9 que reaccionó frente a un epítipo conformacional específico de RHDVb. Además, se disponía de un anticuerpo policlonal de cabra producido frente a VLPs de RHDVb y que interaccionaba frente a VLPs tanto de RHDVb como de RHDV-G1.

En el presente trabajo se ha colaborado para el desarrollo de una herramienta rápida de diagnóstico diferencial para la nueva variante del virus RHDV, basado una tira inmunocromatográfica de flujo lateral (Dalton *et al.*, 2017). Este ensayo requiere la inmovilización del anticuerpo 3A10 en una región de una membrana porosa (zona R, **Figura 25**). Las muestras analizadas que pueden ser VLPs, exudados de la cavidad abdominal de conejos u homogeneizados al 10 % de hígado, se añaden a una solución coloidal que contiene, marcado con partículas de látex, el anticuerpo 2D9. Esta solución coloidal también contiene una molécula marcadora que al ser detectada en la zona control (zona C), indica el correcto funcionamiento del ensayo. La mezcla de la muestra, aplicada sobre la zona M, se absorbe y fluye a lo largo de la membrana por acción de la capilaridad. La concentración de las moléculas marcadoras puede visualizarse a simple vista con

líneas de color rojo (R) y/o verde (C), determinando el resultado del ensayo. Atendiendo a los resultados obtenidos mediante este ensayo, permitió la detección específica de muestras de VLPs de RHDVb purificadas, a diferencia de las pruebas con VLPs de RHDV-G1 que no fueron detectadas. El análisis de distintas cantidades de VLPs de RHDVb purificadas mostró que el límite de detección de este ensayo de inmunocromatografía lateral es de 7,8 ng/mL (datos no mostrados). A modo de ejemplo, en la **Figura 25** se muestran los resultados obtenidos del análisis por separado de homogeneizados de hígado de conejos infectados con el aislado RHDV-Ast89 o RHDV-Nav10/11. Como puede observarse, estos resultados indican la detección específica de viriones de RHDV-Nav10/11 y la falta de detección de RHDV-Ast89.

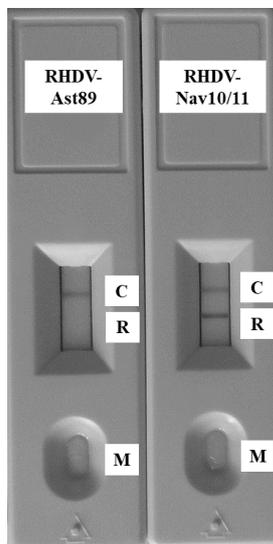


Figura 25. Análisis de la presencia de viriones de RHDV-Ast89 (RHDV-G1) y RHDV-Nav10/11 (RHDVb) usando un dispositivo de inmunocromatografía lateral. (M) Muestra; (C) Control; (R) Resultado. La presencia de la banda R indica la detección de RHDVb en la muestra.

Para evaluar el rendimiento del ensayo, se analizaron un total de 91 muestras de hígado de conejos (**Tabla 17**). Previamente, para las mismas muestras, se determinó la presencia de RHDV o RHDVb mediante las técnicas standard de ELISA (*INGEZIM RHDV DAS kit*, INGENASA) y de RT-PCR (Dalton *et al.*, 2014) para la detección de antígeno o copias de ARN virales, respectivamente. En las 91 muestras, se determinó la presencia de RHDVb (67 muestras), de RHDV-G1 (8 muestras) o de RHDVa (2 muestras), y 14 de las muestras fueron negativas para RHDV (**Tabla 17**). El análisis mediante las tiras de inmunocromatografía lateral específica frente a RHDVb, mostró resultados positivos (banda de color rojo en zona R) en las 67 muestras que contenían RHDVb. Las 24 muestras restantes (negativas o, con RHDV-G1 o RHDVa), dieron como resultado la banda verde del control positivo (zona C), demostrando la presencia de la muestra y el correcto funcionamiento del ensayo, pero la ausencia de la banda roja en la zona R indicó

el resultado negativo para RHDVb. Los datos obtenidos indican la sensibilidad del 100 % y la especificidad del 100 % frente a RHDVb de esta herramienta diagnóstica. Los valores predictivos positivo y negativo fueron, ambos casos, del 100 %. El valor kappa obtenido de 1 indica una buena concordancia en los resultados.

Tabla 17. Muestras positivas y negativas analizadas mediante (RT-PCR y ELISA) o inmunocromatografía lateral.

		RT-PCR y ELISA	
		+	-
Inmunocromatografía RHDVb	+	67	0
	-	0	24

Como se ha demostrado, se trata de una herramienta de aplicación rápida para la detección de brotes de RHDVb directamente en el campo o granja, ayudando a tomar lo antes posible las decisiones necesarias para controlar la transmisión de la enfermedad. Sin embargo, este diagnóstico no permite la cuantificación de la cantidad de antígeno viral presente en la muestra, o el análisis conjunto de grandes números de muestras. Por eso, en este trabajo también se planteó el diseño de un ELISA para la detección diferencial de antígeno de RHDVb.

El presente trabajo contribuyó, en colaboración con el SERIDA, al desarrollo de un ELISA tipo sándwich específico frente a RHDVb. Para ello se plantearon diferentes aproximaciones según la combinación de los distintos anticuerpos de los que se disponía, mostradas en la **Tabla 18**. Además, se determinaron las concentraciones óptimas de anticuerpos monoclonales o policlonales, extracto de hígado y conjugado para la detección de IgGs. Un total de 88 muestras de hígado de conejo empleadas fueron previamente clasificadas en 5 grupos (**Tabla 19**) mediante secuenciación de fragmentos amplificados por RT-PCR de dos regiones del genoma que corresponden a la región de VP1 y a la región de la polimerasa (Dalton *et al.*, 2018a; Dalton *et al.*, 2014).

En el estudio de discriminación de muestras positivas y negativas, se observó que los ELISAs donde el anticuerpo policlonal de cabra frente a VLPs de RHDVb se encuentra tapizando la placa (ELISA 1 y ELISA 2, **Tabla 18**), no permiten diferenciar entre las

muestras de referencia positivas y negativas. Por tanto, se descartaron estos dos modelos de ELISA para los siguientes pasos de validación.

Tabla 18. Resumen del diseño de los ELISAs tipo sandwich.

Nº ELISA	Anticuerpo de captura	Incubación 1	Incubación 2	Incubación 3
ELISA 1	Policlonal de cabra anti-RHDVb	Extracto de hígado	Monoclonal 2D9	Anti-IgG ratón-HRP
ELISA 2	Policlonal de cabra anti-RHDVb	Extracto de hígado	Monoclonal 3A10	Anti-IgG ratón-HRP
ELISA 3	Monoclonal 3A10	Extracto de hígado	Policlonal de cabra anti-RHDVb	Proteína G-HRP
ELISA 4	Monoclonal 2D9	Extracto de hígado	Policlonal de cabra anti-RHDVb	Proteína G-HRP

En el caso de los métodos donde se utilizó uno de los monoclonales, 3A10 (ELISA 3) o 2D9 (ELISA 4) para la captura del antígeno, y el anticuerpo policlonal de cabra para la detección de partículas virales, fue posible discriminar entre las muestras positivas y negativas probadas. Sin embargo, el ELISA 3, basado en el anticuerpo monoclonal 3A10, para capturar el antígeno, no mostró capacidad de diferenciar entre diferentes tipos de muestras de RHDV, puesto que los valores medios de porcentaje de densidad óptica relativa obtenidos en los grupos RHDVb, RHDVbrec, RHDVa y RHDV-G1 se encontraron por encima del valor de punto de corte (**Tabla 19**). Con respecto al ELISA basado en el anticuerpo de captura 2D9 (ELISA 4), se detectaron como positivas todas las muestras de hígado clasificadas en los grupos RHDVb y RHDVbrec (**Tabla 19**), de lo que se deduce que el grado de sensibilidad de este ELISA es del 100 %. El total de las 28 muestras clasificadas dentro de los grupos no infectados o RHDV-G1, y 7 de las 8 muestras incluidas en el grupo RHDVa mostraron resultados negativos. Estos resultados indican que la especificidad de este ELISA es del 97,22 % (35 de las 36 muestras no pertenecientes a RHDVb fueron negativas). La media del porcentaje de densidad óptica relativa de los grupos RHDV-G1, RHDVa y no infectados fue significativamente menor que la del grupo RHDVb, en todos los casos, con un p-valor <0,0001, mientras que no hubo diferencias significativas entre los grupos RHDVb y RHDVbrec (p=0,998). El valor diagnóstico del ELISA fue de 0,98 y los valores predictivos positivo o negativo fueron de 98,1 % y 100,1 %, respectivamente.

Tabla 19. Análisis ELISA de extractos de hígado de conejo infectados y no infectados con distintos tipos de RHDV, utilizando placas tapizadas con los anticuerpos 3A10 o 2D9.

Grupo	N	3A10 (ELISA 3)		2D9 (ELISA 4)	
		Media±SD	Rango	Media±SD	Rango
RHDVb	40	97,80±21,20	40,00-147,80	98,34±39,82	25,3-180,9
RHDVbrec	12	119,70±54,52	0,00-172,80	95,60±26,06	23,10-120,80
RHDV G1	11	74,91±20,17	41,20-100,2	2,63±2,13	0,3-6,4
RHDVa	8	34,56±33,87	1,3-86,5	3,02±4,50	0,0-13
No infectados	17	5,42±6,62	0-22,8	2,91±1,97	0,20-7,00

Los datos corresponden a las medias del porcentaje de densidad óptica relativa ± desviación estándar; N, número de animales. Los valores del punto de corte calculados fueron: 25 % DO relativa para el ELISA 3 (3A10) y 9 % DO relativa para el ELISA 4 (2D9).

4.3. DISEÑO Y PRODUCCIÓN DE CANDIDATOS VACUNALES FRENTE A LA NUEVA VARIANTE DE RHDV

Con objeto de buscar candidatos vacunales efectivos frente al RHDVb en esta tesis se siguieron distintas líneas de actuación empleando antígenos con distinto nivel de complejidad estructural, desde péptidos sintéticos hasta VLPs, y empleando distintos sistemas de expresión (bacterias o células de insecto) y rutas de administración (oral o parenteral) como se describe, en más detalle, a continuación.

4.3.1. Péptido sintético basado en el lazo 1 del dominio P de RHDV-Nav10/11

En estudios realizados previamente por otros autores se había demostrado que péptidos sintéticos basados en regiones antigénicas de la cápsida viral pueden ser suficientemente inmunogénicos para inducir una respuesta protectora frente al virus. Más concretamente, Wang y colaboradores (2013), mostraron que la vacunación con un péptido sintético basado en la secuencia del lazo 1 del subdominio P2 de un aislado de RHDVa es capaz de proteger frente a la infección por RHDV. Para investigar si en el caso de la nueva variante el lazo 1 de RHDV-Nav10/11 es antigénico y puede inducir una respuesta inmune efectiva en conejos, se conjugó el péptido NL15 (ver **Tabla 13**) con la proteína KLH para obtener KLH-NL15 que se utilizó posteriormente en un ensayo de vacunación.

La síntesis del péptido y la conjugación con la proteína KLH fue realizada por la empresa *Abyntek*. La pureza y masa molecular del péptido conjugado se comprobó mediante técnicas de espectrometría de masas y cromatografía líquida de alta eficacia. El

liofilizado del péptido conjugado se reconstituyó directamente en PBS a pH 7,5 y se utilizó en el ensayo de vacunación en gazapos.

4.3.2. Lactobacilos recombinantes que expresan dominios P de RHDV

El uso de las bacterias lácticas como agentes profilácticos se ha desarrollado en los últimos años dando resultados muy prometedores (Hoang *et al.*, 2015; Martín *et al.*, 2011). Además, en otros estudios de nuestro laboratorio se había conseguido generar lactobacilos recombinantes que expresaban la proteína VP60 de un calicivirus humano (Martín *et al.*, 2004). Las principales ventajas que presenta esta estrategia de producción de antígeno son, una fácil administración por vía oral y una posible capacidad de colonizar el intestino animal permitiendo así que el antígeno permanezca el tiempo suficiente para inducir una respuesta inmune efectiva. Por estas razones, hemos planteado en el presente trabajo la obtención de lactobacilos recombinantes que expresan, con distinta localización celular, el dominio P de un aislado clásico (RHDV-Ast89) o de la nueva variante (RHDV-Nav10/11).

Los casetes de expresión con distintas construcciones de dominios P, para la expresión en forma anclada a la pared o secretada, se produjeron para ser posteriormente clonadas en el vector integrativo derivado de pEM76. Las secuencias de los dominios P fueron amplificadas y subclonadas a partir de los correspondientes plásmidos pMalc2X modificados donde se encontraban optimizadas para su expresión en *E. coli*. La construcción de los distintos casetes de expresión se hizo siguiendo la estrategia desarrollada en Martín *et al.*, 2011. De este modo, para la expresión y secreción de las proteínas, se diseñaron diferentes fusiones transcripcionales entre las secuencias de los dominios P de RHDV-Nav10/11 o RHDV-Ast89 (con o sin cola de histidinas) y distintas regiones del gen promotor de agregación (apf) de *Lactobacillus crispatus* M247. Además, para el caso de expresión del dominio anclado covalentemente a la pared bacteriana la fusión incluía la secuencia que codifica la región de anclaje a la pared de la proteinasa P (prtP). Los plásmidos integrativos generados tras la clonación de las secuencias de dominios P se muestran en la **Figura 26A** y **26B**, respectivamente. Además, puede observarse que los plásmidos integrativos incluyen los genes necesarios para la integración de las construcciones en el genoma de *Lactobacillus*.

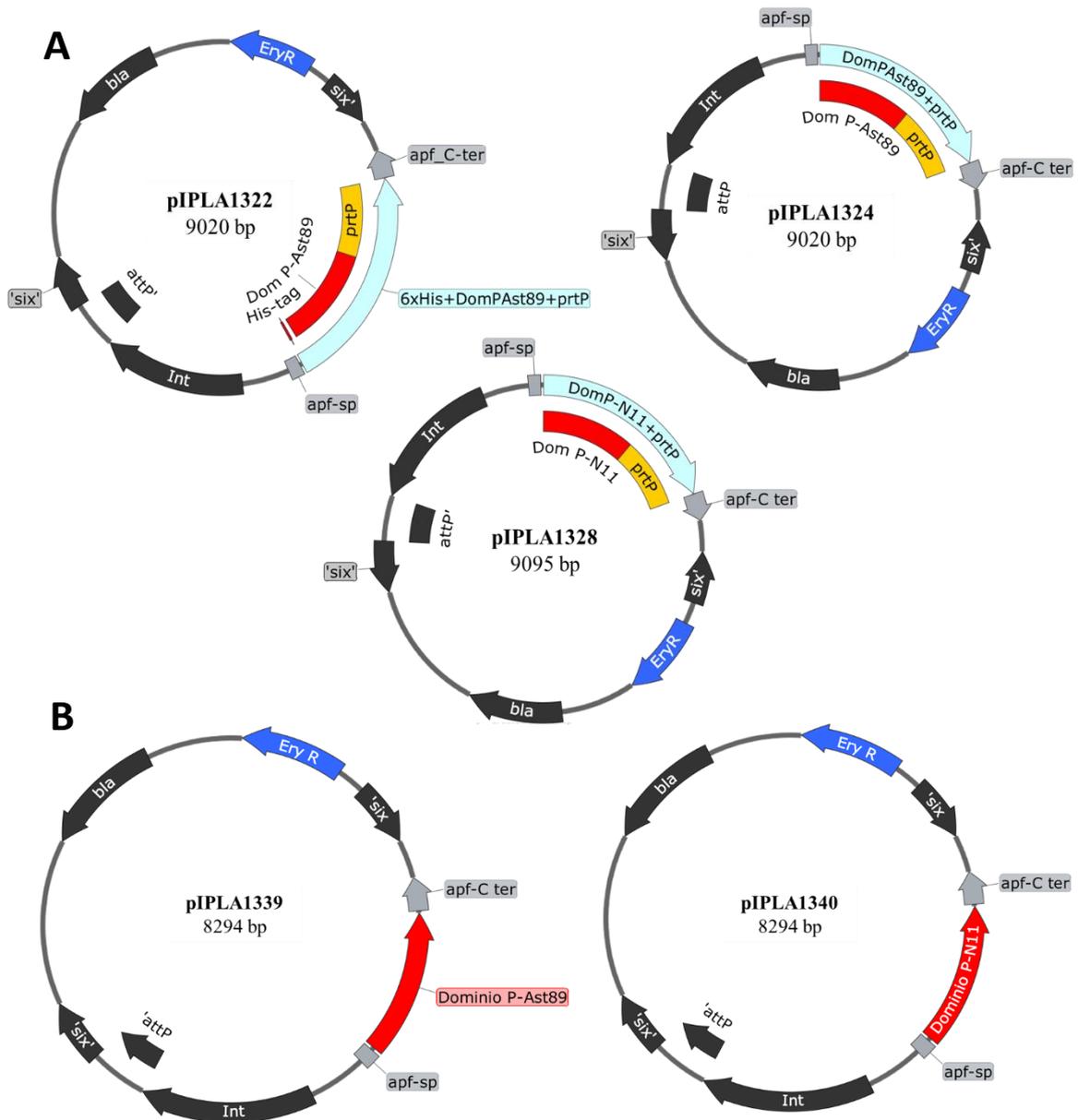


Figura 26. Esquema de plásmidos integrativos para la generación de lactobacilos recombinantes. Se muestran los genes de resistencia a eritromicina (EryR, en color azul) y la región de integración A2 (int-attP'). **A.** Plásmidos integrativos para la expresión de dominios P anclados a la pared: dominio P de RHDV-Ast89 con cola de histidinas (pIPLA1322) o sin cola de histidinas (pIPLA1324), y dominio P de RHDV-Nav10/11 (pIPLA1328). **B.** Plásmidos integrativos para la expresión de dominios P en forma secretable: dominio P de RHDV-Ast89 (pIPLA1339) y dominio P de RHDV-Nav10/11 (pIPLA1340).

Los plásmidos integrativos se transformaron mediante electroporación en *L. paracasei* y tras los pasos integración, depuración y curación de los recombinantes, se comprobó mediante PCR con los cebadores att1 y att7 la correcta integración de las construcciones en el genoma de la bacteria. Cada uno de los casetes de expresión que darán lugar a las

distintas variantes del dominio P una vez integrados en el cromosoma de *L. paracasei* se muestran en la **Figura 27**.

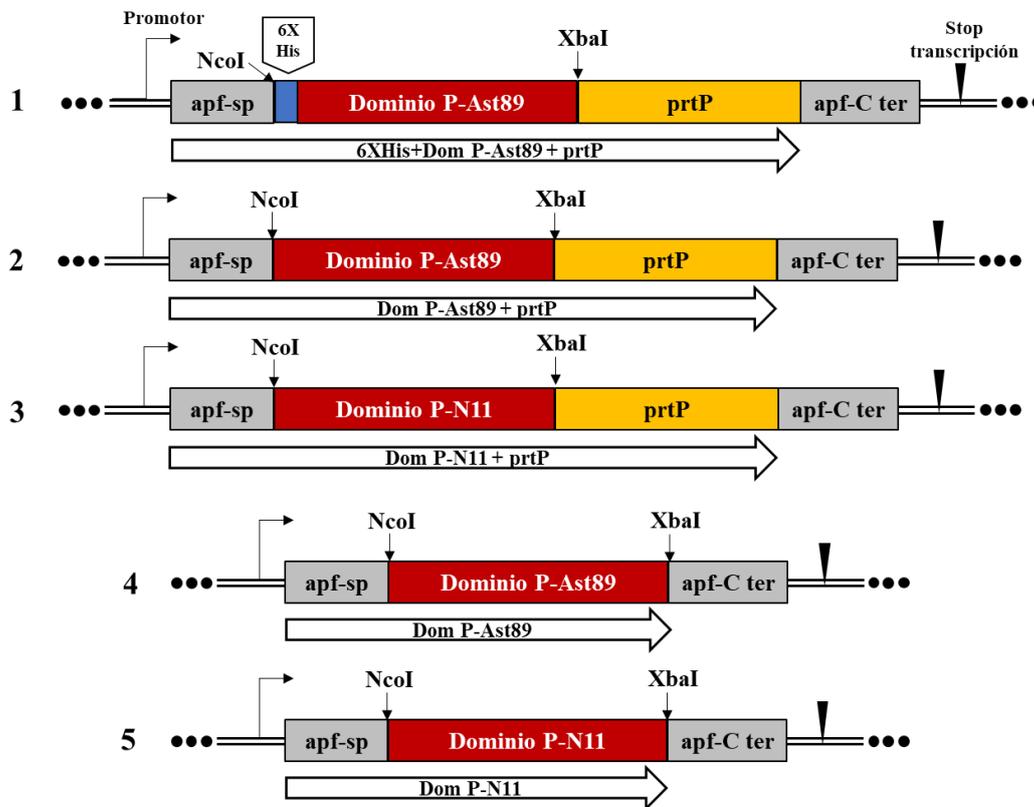


Figura 27. Esquema de los casetes de expresión de los distintos lactobacilos recombinantes. Se muestra el marco abierto de lectura de las distintas construcciones del dominio P (flechas blancas). Versiones ancladas covalentemente a la pared bacteriana de los dominios P de RHDV-Asth89 con cola de histidinas (EM322) (1) y sin ella (EM324) (2) y el dominio P de RHDV-Nav10/11 (EM328) (3). Formas secretable del dominio P de RHDV-Asth89 (EM339) (4) y de RHDV-Nav10/11 (EM340) (5). Se representa el péptido señal de secreción del gen apf (apf-sp) y el extremo carboxilo terminal del mismo gen (apf-C ter).

Una vez realizadas las construcciones anteriores, se analizó la expresión y producción de los dominios P mediante distintas técnicas. Puesto que esta estrategia se basa en la expresión constitutiva no inducible de las proteínas, se esperaban bajos niveles de producción, por esa razón, se eligió la técnica de citometría de flujo para la detección de lactobacilos que expresan dominios P anclados a la pared celular. El anticuerpo primario empleado fue el policlonal generado frente a RHDV (Virlab) que sería detectado mediante un anticuerpo secundario marcado con un fluorocromo.

Los resultados obtenidos por citometría de flujo (**Figura 28**), muestran como los perfiles de emisión de fluorescencia de los lactobacilos con dominios P anclados a la

pared (EM322, EM324 y EM328) poseen un leve desplazamiento hacia la derecha, en comparación con los lactobacilos wt (BL23) cuyo valor de fluorescencia está en torno a 10^0 (se considera que no hay fluorescencia). Las medias logarítmicas observadas para los recombinantes EM322, EM324 y EM328 se encuentran en 11,1, 11,5 y 10,1, mientras que para BL23 es de 1,98. Sin embargo, como se observa en las gráficas de la **Figura 28**, en los tres cultivos de recombinantes aparece una pequeña población de células o restos celulares que no presentan fluorescencia (se indican rodeadas en naranja).

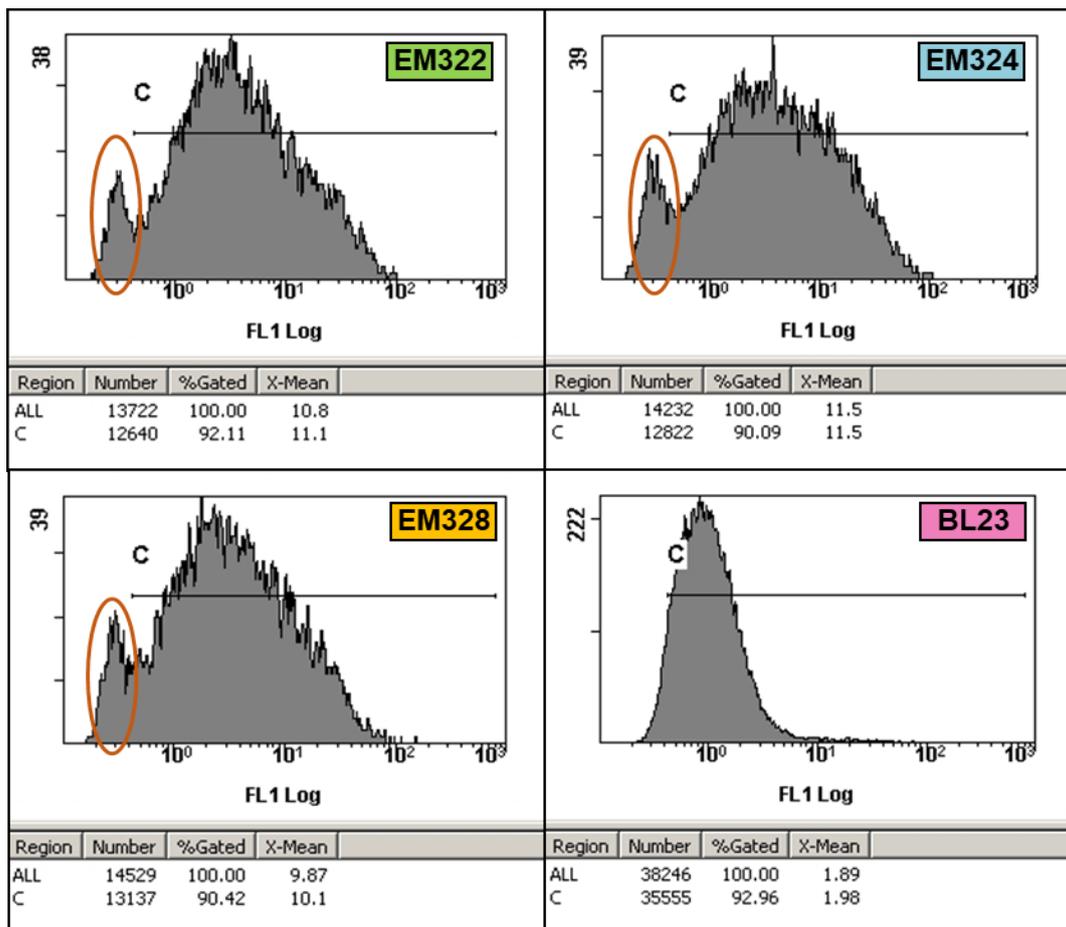


Figura 28. Análisis de la expresión de dominios P por citometría de flujo. Se muestran las medidas de la intensidad de fluorescencia (FL1) para demostrar la presencia de dominios P anclados a la pared bacteriana, tras un tratamiento con el antisuero policlonal Virlab. BL23, lactobacilos silvestres; EM322, lactobacilos que expresan dominios P de RHDV-Ast89 con Histag; EM324, lactobacilos que expresan dominios P de RHDV-Ast89; EM328, lactobacilos que expresan dominios P de RHDV-Nav10/11. Los círculos naranja indican poblaciones o restos celulares que no presentan fluorescencia.

Para estudiar la expresión de los dominios P en forma secretable, en los lactobacilos recombinantes EM339 (dominio P RHDV-Ast89) y EM340 (dominio P RHDV-Nav10/11) se analizó el sobrenadante procedente de los cultivos, haciendo previamente una precipitación con ácido tricloroacético (TCA) con el fin de concentrar las muestras. Se emplearon distintos volúmenes de los precipitados para realizar electroforesis y análisis Western blot empleando el suero policlonal Virlab. En los estudios realizados no se consiguió la detección de ninguna proteína, por tanto, no puede demostrarse la presencia de dominios P en el sobrenadante. Esto indica que, o no se están expresando y liberando correctamente al medio, o bien, están presentes en una cantidad demasiado reducida para ser detectable mediante la técnica empleada.

4.3.3. Fusión GST-dominio P de RHDV-Nav10/11

Actualmente, no es posible diferenciar los animales que han sido vacunados de los que han estado en contacto con el virus silvestre. Por esto, es recomendable desarrollar vacunas marcadas que, de alguna forma, permitan hacer un diagnóstico más específico del origen de anticuerpos frente a RHDV. En este trabajo se ha propuesto el marcaje del antígeno vacunal con la proteína GST que, mediante una detección de anticuerpos frente a ella, permitiría diferenciar animales vacunados de los que no lo están. El antígeno vacunal propuesto como proteína de fusión con GST es el dominio P de RHDV-Nav10/11 optimizado para su expresión en bacterias.

La secuencia del dominio P se obtuvo a partir del plásmido pMalc2X-DomPN11opt. La subclonación del dominio al vector receptor (pGex4T1) se realizó utilizando los sitios de restricción BamHI y NotI que flanquean la secuencia del dominio P. El plásmido generado pGex4T1+PdomN11opt contiene en la misma pauta de lectura la proteína GST y el dominio P de RHDV-Nav10/11 optimizado como se muestra en la **Figura 29A**. Además, este método permite que en la proteína de fusión resultante exista un sitio de corte para la trombina, facilitando así la separación del dominio P de la proteína GST si fuese necesario. Una vez obtenido el plásmido de expresión y tras comprobar por secuenciación que la secuencia del dominio P se había insertado correctamente, se transformó en la cepa BL21 de *E. coli* para su expresión y purificación. El proceso de purificación se realizó por afinidad utilizando la matriz Glutathione Sepharose™ 4B. En la **Figura 29B**, se han analizado mediante electroforesis (SDS-PAGE) distintas muestras tomadas a lo largo del proceso de purificación, observándose la presencia de una banda

de 61,2 kDa con el tamaño esperado para la proteína de fusión (GST-P). Posteriormente, para comprobar la presencia del sitio de corte por trombina se volvió a unir la fusión a la matriz y se incubó con la proteasa, de modo que, finalmente, se obtuvo el dominio P aislado, quedando la proteína GST unida a la matriz (**Figura 29C**).

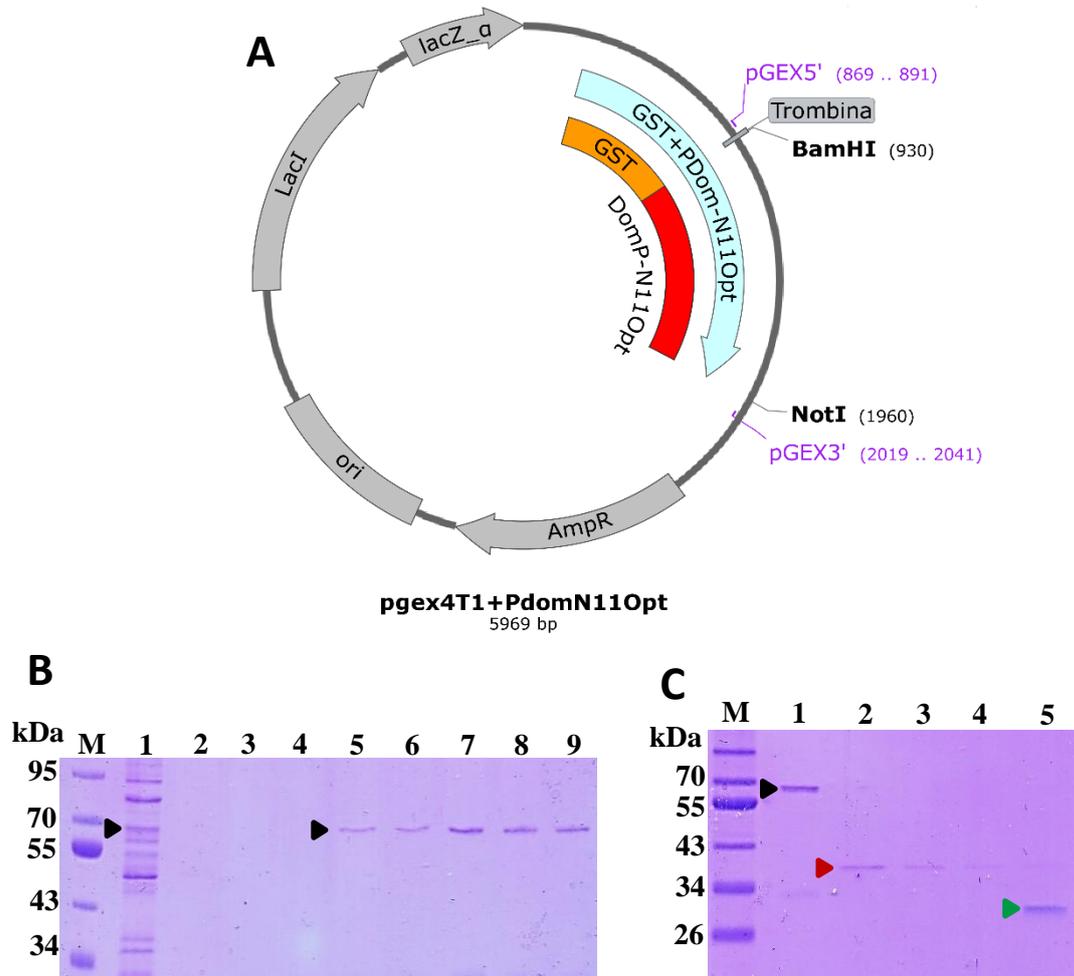


Figura 29. Vector de expresión, análisis de la producción y purificación de la proteína de fusión GST-dominio P de RHDV-Nav10/11. A. Esquema del plásmido de expresión de la fusión GST-P. B. Análisis electroforético de muestras en distintas etapas del proceso de purificación: (1) material no adsorbido a la matriz; (2-4) lavados de la matriz; (5) matriz antes de la elución; (6-8) eluidos sucesivos de la proteína de fusión; (9) matriz después de la elución. Las flechas negras indican la posición de la proteína de fusión con un tamaño de 61 kDa. C. Análisis electroforético del proceso de digestión de la fusión con trombina: (1) proteína de fusión unida a la matriz; (2-4) eluidos conteniendo dominio P; (5) matriz tras la elución. La flecha roja indica la banda que corresponde al dominio P (35 kDa) y la flecha verde corresponde a la proteína GST (26 kDa).

Para comprobar que el dominio P de RHDV-Nav10/11 generado en forma de fusión con GST tenía un buen estado de plegamiento y conformación, se realizó un análisis mediante Dot blot con el anticuerpo monoclonal 2D9 (**Figura 30**). Se incluyó en el análisis anticuerpo anti-GST como control. Puede observarse, que 2D9 interacciona con la fusión GST-P, al igual que con el control positivo de VLPs, aunque la señal frente al dominio P aislado tras el corte con trombina es débil, lo que podría deberse a la menor cantidad de proteína que hay en la muestra. El anticuerpo anti-GST, como se esperaba, interacciona solo con aquellas muestras que contienen GST.

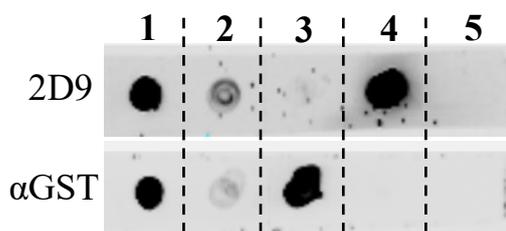


Figura 30. Análisis Dot blot de la reactividad con anticuerpos de la fusión GST-dominio P. (1) GST-dominio P; (2) dominio P; (3) GST; (4) VLPs de RHDV-Nav10/11; (5) BSA.

Finalmente, dado que el dominio P fusionado a GST mantenía una conformación similar al de los viriones, o al que presenta en las VLPs, se ensayó la proteína GST-P como antígeno vacunal, para evaluar si induce protección frente a la infección por el virus.

4.3.4. Partículas virales similares al virus (VLPs)

La formación de VLPs a partir de la proteína mayoritaria de la cápsida de los calicivirus producida en distintos sistemas de cultivos celulares ya ha sido demostrada en varios estudios (Marin *et al.*, 1995; Nagesha *et al.*, 1995; Pérez-Filgueira *et al.*, 2007; Plana-Duran *et al.*, 1996), describiendo la capacidad de la proteína VP1 de RHDV para autoensamblarse y formar estas partículas similares al virus que no contienen el genoma viral. Por tanto, esta estrategia puede tener interés a la hora de diseñar una vacuna frente a RHDV de la nueva variante puesto que el antígeno vacunal sería muy similar al virus y podría inducir en animales una respuesta inmune específica frente al virus.

En el presente trabajo se estudió el diseño y la producción de VLPs del aislado de la nueva variante (RHDV-Nav10/11) en células de insecto utilizando baculovirus recombinantes. En cuanto al nivel de complejidad del huésped para la expresión de las VLPs, se han estudiado dos sistemas de hospedadores. En primer lugar, cultivos celulares

de distintas líneas de insecto (Sf9 o HF) y, en segundo lugar, utilizando crisálidas (trabajo realizado en colaboración con *Algenex*).

La optimización de la secuencia de VP1 de RHDV-Nav10/11 con el software online *GeneArt® Gen Synthesis* para su expresión en células de insecto fue realizado en nuestro laboratorio. Esa secuencia fue cedida a la empresa *Algenex* que se centró en la inserción de la secuencia de VP1 en el casete de expresión TopBac TB3.2 que permite una mayor viabilidad celular (Gomez-Sebastian *et al.*, 2014) y la producción y rescate de los baculovirus recombinantes obtenidos, expresaban la secuencia optimizada de VP1 de RHDV-Nav10/11, fueron utilizados en nuestro laboratorio o en la empresa colaboradora ALGENEX para la obtención de las VLPs. El análisis de la expresión y rendimientos en la producción de VLPs se realizó variando el tipo celular y, con ello, la producción intracelular o extracelular de las VLPs (HF o Sf9, respectivamente) y, por otro lado, utilizando secuencias de VP1 optimizadas y no optimizadas para la expresión en células de insecto (**Tabla 20**). Puede observarse que en las células HF la producción de VLPs es 1,7 veces mayor que en células Sf9 con la secuencia optimizada de VP1, y unas 23,7 veces utilizando la secuencia no optimizada. Cuando se tiene en cuenta la influencia de la optimización las diferencias son también muy importantes. Concretamente, en las células HF se obtiene 3,6 veces más cantidad de VLPs a partir de la secuencia optimizada, mientras que en células Sf9 la diferencia es aún mayor obteniéndose hasta 50 veces más cantidad con la secuencia optimizada de VP1.

Tabla 20. Influencia del uso de distintos sistemas celulares y de la optimización de secuencias del gen VP1 en la producción de VLPs.

Tipo celular	Secuencia VP1 RHDV-Nav10/11	Producción de VLPs (µg/millón de células)
HF	Optimizada	138
	No optimizada	38
Sf9	Optimizada	80
	No optimizada	1,6

Las condiciones de cultivo, infección y purificación en los distintos tipos celulares presentan diferencias y, en ciertos casos, algunas ventajas o desventajas. En el caso de la purificación a partir de monocapas de células HF (en frascos T150) la infección con baculovirus se realizó con una m.o.i. de 5 y el tiempo de incubación tras la infección fue

de 3 días. Sin embargo, en cultivos en suspensión de sf9 (matraces Erlenmeyer de 250 mL) la infección se realizó con una m.o.i. de 10. En cuanto al protocolo de purificación es dónde hay mayores diferencias entre ambos sistemas de producción. En células HF, la producción intracelular requiere la rotura celular y, con ello, facilitando la liberación de proteasas que puede afectar a la estabilidad de las VLPs, lo que alarga y dificulta el proceso de purificación. Las células Sf9 que secretan las proteínas al medio, permiten la purificación a partir del sobrenadante de cultivo que reduce tanto el tiempo de trabajo como la posibilidad de degradación de las proteínas.

Una vez purificadas correctamente las VLPs de RHDV-Nav10/11 con la secuencia optimizada de VP1, se obtuvieron cantidades suficientes para su utilización en ensayos de inmunización. Las VLPs purificadas se analizaron en distintas diluciones por SDS-PAGE y mediante ensayos Western blot utilizando el suero policlonal Virlab (**Figura 31**). A la vez también se analizaron diluciones de extractos crudos de crisálidas infectadas con baculovirus proporcionadas por *Algenex*, que producen VLPs con la misma secuencia optimizada de VP1. En el análisis por electroforesis (SDS-PAGE) se estimó la cantidad de VP1 presente en los extractos de crisálidas comparándola con la concentración conocida previamente de las muestras de VLPs purificadas utilizadas en el mismo gel.

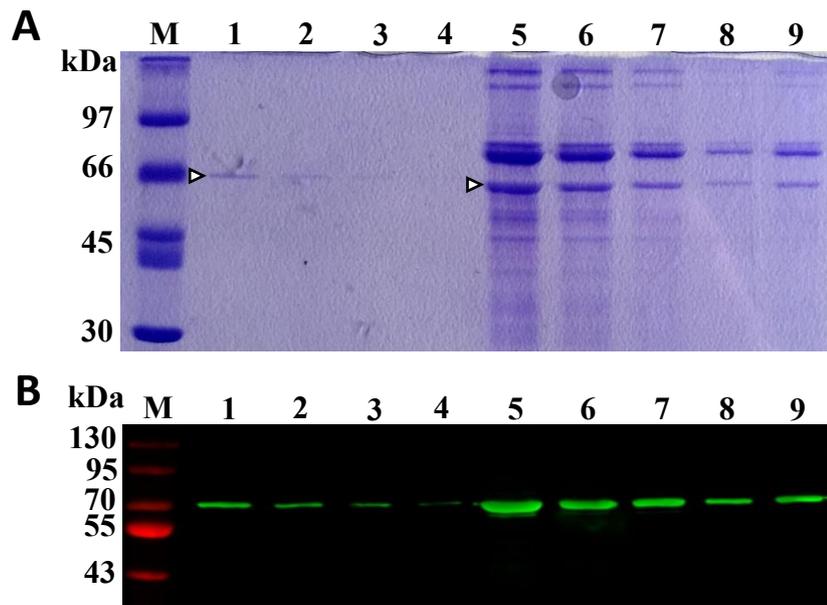


Figura 31. Análisis SDS-PAGE de muestras de VLPs purificadas y extractos de crisálidas que producen VLPs. **A.** Electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) de VLPs purificadas de cultivos de Sf9 o extractos de crisálidas infectadas. VLP purificadas (1) 0,1 µg; (2) 0,05 µg; (3) 0,025 µg; (4) 0,012 µg. Extractos de crisálidas diluidos que producen el mismo tipo de VLPs (5) 1/10; (6) 1/20; (7) 1/40; (8) 1/160; (9) 1/80. **B.** Análisis Western blot de las VP1 de RHDV-Nav10/11 utilizando el antisuero policlonal Virlab (1:5000). Las puntas de flecha indican la posición de la VP1.

4.4. ESTUDIOS DE PROTECCIÓN DE DISTINTOS CANDIDATOS VACUNALES FRENTE A RHDVb

En el presente trabajo se han estudiado distintos candidatos vacunales basados en la proteína principal de la cápsida del virus o bien en regiones parciales de ella. A su vez, cómo objetivos importantes nos hemos planteado un sistema de administración oral de la vacuna (en forma de vacuna oral viva), el diseño de una vacuna marcada y distintas estrategias de expresión y producción *in vitro* de VLPs utilizando baculovirus recombinantes que eviten las actuales prácticas de infección experimental de animales para la obtención de las vacunas disponibles frente a RHDV.

4.4.1. Péptido sintético basado en el lazo 1 del dominio P de RHDV-Nav10/11

En el estudio de la eficacia de la vacuna basada en el lazo 1 de la VP1, se utilizaron un total de 8 gazapos divididos en dos grupos: un grupo de 6 conejos vacunados con KLH-NL15 (nombrados desde C113 hasta C118) y un grupo control de 2 animales inmunizados

con KLH (nombrados como C111 y C112). En la primera inmunización se utilizó el adyuvante completo de Freund y, en las demás, el adyuvante incompleto de Freund. Se realizaron un total de 5 inyecciones por vía intramuscular, con dosis de 1 mg del antígeno por animal. Tras la primera inmunización, las siguientes se realizaron a los 14, 28, 44 y 61 días. Previamente a cada inyección se extrajo suero de los animales, para hacer un seguimiento de la producción de anticuerpos frente a RHDV (**Figura 32**).

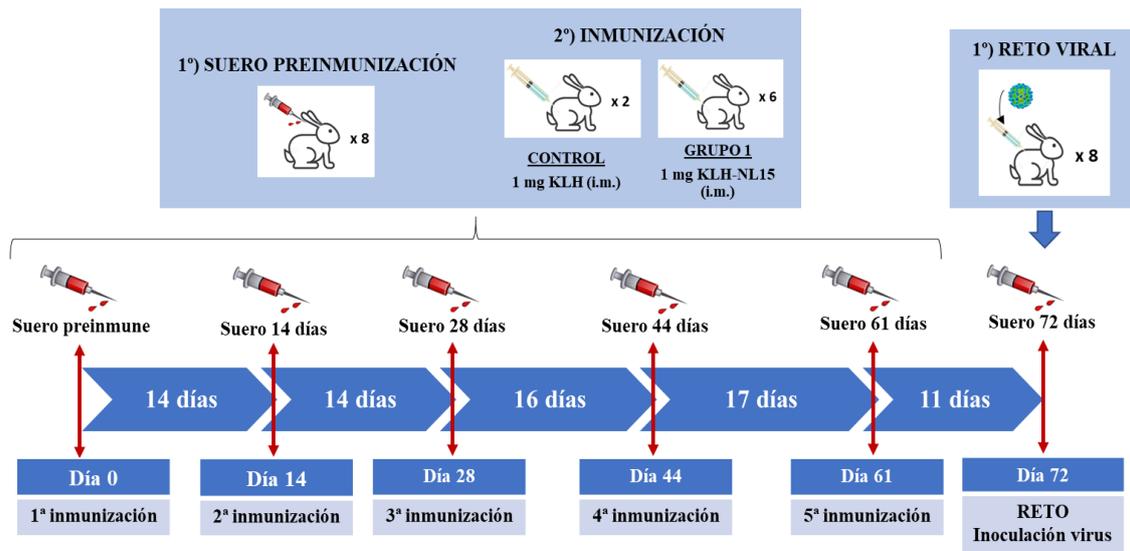


Figura 32. Esquema del diseño experimental del ensayo de inmunización con el péptido sintético conjugado KLH-NL15.

Las muestras de suero recogidas antes de las 4 primeras inmunizaciones (días 0, 14, 28 y 44) se analizaron mediante un kit de ELISA comercial que detecta la presencia de anticuerpos frente a RHDV. Los resultados obtenidos (**Tabla 21**) y no mostraron la seroconversión de ninguno de los animales a lo largo de las 3 primeras inmunizaciones. Aunque parece aumentar la señal obtenida en algunos casos, como en los sueros de los conejos C112, C113 y C114 del día 44 tras la primera inmunización, no pueden llegar a considerarse sueros positivos frente a RHDV, puesto que no alcanzan los valores descritos por el fabricante del kit de ELISA. Dado que el antígeno presente en el sistema comercial de ELISA deriva de un RHDV clásico y el antígeno vacunal empleado se basa en el lazo 1 de RHDVb, cuya secuencia es diferente al de RHDV clásico, centraremos el análisis de los sueros recogidos en los posteriores muestreos mediante su reacción con antígenos más específicos de RHDVb, o con el propio antígeno vacunal.

Tabla 21. Análisis de la presencia de anticuerpos frente a RHDV en sueros de conejos tratados con KLH o KLH-NL15 empleando un sistema ELISA comercial (INGENASA).

Vacuna	Animal	día 0	día 14	día 28	día 44
KLH	C111	0,076	0,074	0,223	0,189
	C112	0,161	0,126	0,186	0,255
KLH-NL15	C113	0,091	0,089	0,138	0,282
	C114	0,109	0,184	0,194	0,253
	C115	0,175	0,112	0,122	0,132
	C116	0,126	0,175	0,207	0,112
	C117	0,080	0,083	0,197	0,176
	C118	0,078	0,177	0,153	0,217

* El punto de corte del ELISA determinado por el fabricante del kit es de 0,3.

Los sueros obtenidos el último día de inmunización (sueros 61 días) se analizaron mediante Western blot para comprobar la presencia de anticuerpos frente a antígenos de RHDVb o del propio péptido vacunal (**Figura 33**). Además, la utilización del análisis por Western blot tiene por objeto investigar si los anticuerpos obtenidos eran específicos, y no interaccionaban con otras proteínas que no contuviesen el péptido NL15. Los resultados obtenidos mostraron la presencia de anticuerpos inespecíficos en algunos animales incluido uno de los controles inmunizado sólo con KLH (C111). Se puede observar en la **Figura 33** (imagen C111, calles 2, 3 y 4) que ese animal produce anticuerpos que interaccionan con la fusión KLH-NL15, KLH y GST-P de RHDV-Nav10/11, respectivamente, pero no identifica a VLPs de RHDV-Nav10/11 (calle 1). Como era de esperar todos los animales parecen tener anticuerpos frente a la proteína KLH que es una potente inductora del sistema inmune. Sólo uno de los conejos inmunizados con la fusión del péptido sintético, nombrado como C118 (**Figura 33**), parece tener anticuerpos que reaccionan con el dominio P de RHDV-Nav10/11, aunque podría tratarse de anticuerpos inespecíficos puesto que también interaccionan con algunas impurezas de la muestra de GST-P. En el caso del suero del conejo C115 (inmunizado con KLH-NL15) parece haber una interacción de los anticuerpos con las VLPs de RHDV-Nav10/11 y la fusión GST-P, aunque dicha señal es muy débil y también parece ser inespecífica.

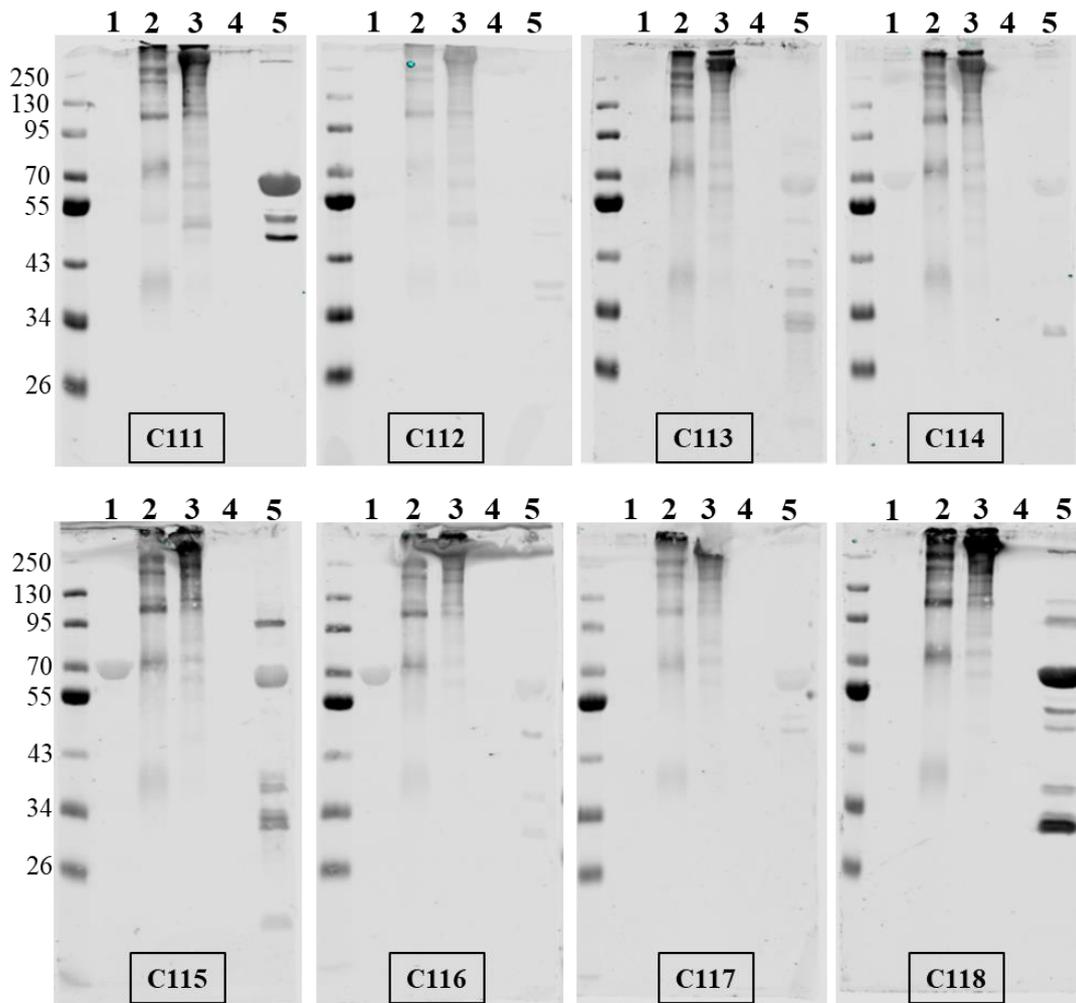


Figura 33. Análisis Western blot de la presencia de anticuerpos en sueros de conejos a los 61 días del primer tratamiento con KLH-NL15 (C113-C118) o KLH (C111 y C112). Los antígenos empleados fueron: (1) VLPs de RHDV-Nav10/11; (2) KLH-NL15; (3) KLH; (4) péptido NL15; (5) fusión GST-P de RHDV-Nav10/11. Los sueros se utilizaron en una dilución 1:50.

Puesto que los resultados obtenidos mediante Western blot con los sueros a los 61 días del primer tratamiento no aportaron resultados fácilmente interpretables, se decidió hacer un análisis de la presencia de anticuerpos mediante ELISA. Por esta razón, los sueros obtenidos justo antes de iniciar el reto viral (72 días tras el primer tratamiento), se analizaron mediante ELISA empleando como antígenos VLPs de RHDV-Nav10/11, proteína KLH, péptido NL15 y la fusión KLH-NL15, en cantidades de 100 ng antígeno/pocillo. En la **Figura 34** se muestran los resultados obtenidos donde puede observarse que no hubo diferencias significativas en los niveles de IgG frente a VLPs, KLH o KLH-NL15 entre los animales inmunizados con el conjugado KLH-NL15 o sólo la proteína KLH ($p=0,02$). Sin embargo, los niveles de IgG frente al péptido sintético

NL15 fueron aparentemente mayores en los conejos vacunados con el KLH-NL15 respecto al grupo control inmunizado sólo con KLH (**Figura 34**). Cuando se compararon, los niveles de anticuerpos en conjunto de todos los animales frente a los diferentes antígenos, se observa que los mayores niveles de anticuerpos se obtuvieron frente a la fusión KLH-NL15. La cantidad fue mucho menor frente a la proteína KLH, aunque resultaron mayores que los presentes frente al péptido NL15 o VLPs de RHDV-Nav10/11 (**Figura 34**).

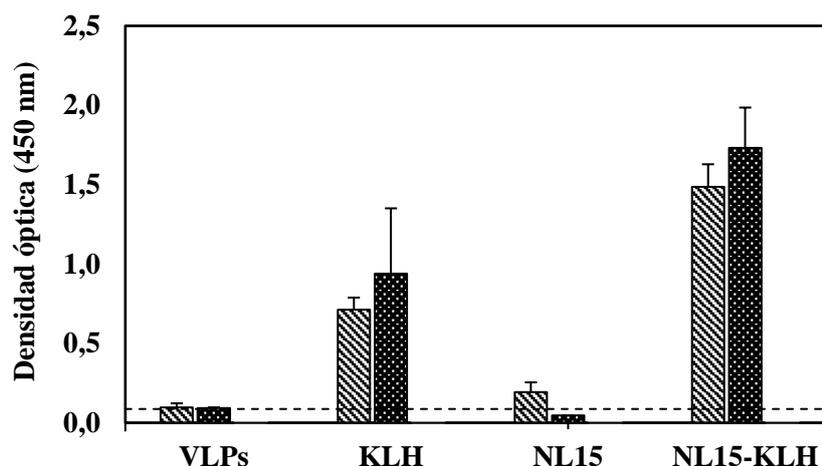


Figura 34. Análisis mediante ELISA de la presencia de anticuerpos en sueros de conejos a los 72 días después del primer tratamiento con KLH-NL15 o KLH. Se representan las medias y desviación estándar de la densidad óptica obtenida en los sueros de los 4 animales tratados con KLH-NL15 (rayado) y los 2 animales tratados con KLH (punteado). Los antígenos utilizados fueron: VLPs de RHDV-Nav10/11, KLH, péptido NL15 o KLH-NL15. La línea de trazos indica el punto de corte de positividad del ensayo.

Para evaluar la protección conferida por el conjugado KLH-NL15 frente a RHDVb, 11 días tras la última inmunización (72 días tras la primera inmunización) se inocularon todos los animales con RHDV-Gal08/13. El virus se administró por vía subcutánea con una dosis por animal de aproximadamente 10 veces la dosis letal 50 (DL_{50}). Después de la administración del virus se comprobó el estado general de los animales. Durante las primeras 36 horas tras la infección se mantuvo el 100 % de supervivencia de todos los animales (**Figura 35**). A partir de ese momento la tasa disminuyó hasta el 50 % a las 48 horas post-infección (hpi) en ambos grupos, manteniéndose en el control (KLH) hasta las 66 hpi; mientras que en el grupo vacunado con el conjugado KLH-NL15 la tasa de supervivencia bajo hasta el 25 % a las 54 hpi. A las 72 hpi todos los animales habían sucumbido a la infección con RHDVb.

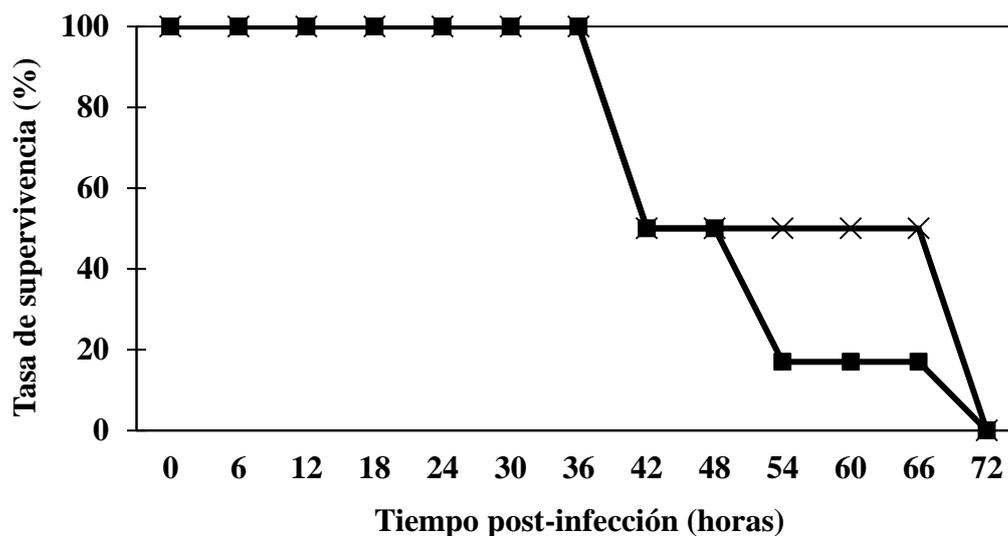


Figura 35. Supervivencia de conejos tratados con el péptido conjugado KLH-NL15 frente a la infección con RHDVb. (Cuadrados) animales tratados con el conjugado KLH-NL15; (Cruces) animales tratados con KLH.

4.4.2. Evaluación de la eficacia de la vacunación oral con lactobacilos recombinantes

Con el objetivo de comprobar la eficacia de los antígenos vacunales propuestos en forma de bacterias lácticas, que expresan los dominios P de RHDV anclados a la pared, se realizó un experimento de vacunación por vía oral con los distintos lactobacilos recombinantes por separado. Además de la producción de anticuerpos y tasa de supervivencia frente al virus RHDVb se hizo un seguimiento para determinar la posible colonización del intestino de los conejos por parte de estas bacterias.

El ensayo de vacunación oral se realizó utilizando un total de ocho conejos hembra de la raza NZW de tres meses de edad y un peso aproximado de 2,7 kilogramos. Como se muestra en la **Figura 36**, se establecieron tres grupos de dos animales cada uno, que se inmunizaron con distintas cepas recombinantes de lactobacilos que expresaban construcciones de dominios P ancladas a la pared: (grupo 1) EM322, dominio P de RHDV-Ast89 con cola de histidinas; (grupo 2) EM324, dominio P de RHDV-Ast89; (grupo 3) EM328, dominio P de RHDV-Nav10/11. Como control se inmunizaron dos animales con la cepa BL23 no transformada de *L. casei*.

La primera administración (día 0) se realizó por vía oral con 4 mL por animal de un extracto de cultivo de lactobacilo resuspendido en PBS (pH 7,5) y que tenía un título aproximado de $2,5 \times 10^9$ ufc/mL (dosis de 1×10^{10} ufc/animal). El segundo tratamiento (día 25) se realizó con una dosis 8,8 veces mayor de bacterias por animal y la suspensión bacteriana se realizó en leche desnatada al 10 % dado que, según otros estudios, los lactobacilos se conservan mejor y mejoran los resultados de inmunizaciones (comunicación personal de M^a Cruz Martín, IPLA).

Para estudiar la colonización del intestino de conejo por estas bacterias recombinantes, se recogieron muestras de heces al día siguiente de cada vacunación y, tras el reto viral, *post-mortem* se tomaron secciones de distintas partes del intestino delgado.

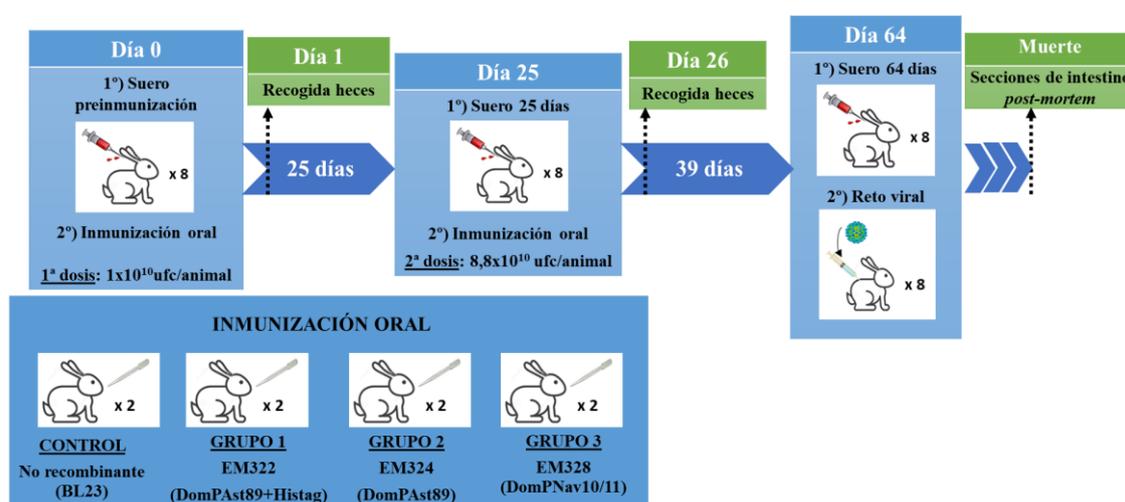


Figura 36. Esquema del diseño experimental para el ensayo de vacunación oral con lactobacilos recombinantes.

La producción de anticuerpos frente a RHDV se analizó mediante ELISA enfrentando a VLPs de RHDV-Nav10/11 (**Figura 37A**) o RHDV-Ast89 (**Figura 37B**) con los sueros recogidos a los 25 días tras la primera inmunización (25 dpi) y a los 39 días después de la segunda, equivalentes a 64 días después de la primera inmunización (64 dpi). Los valores de densidad óptica frente a VLPs de RHDV-Nav10/11 (**Figura 37A**) solo superan el punto de corte del ELISA en los animales del grupo 3 (EM328, lactobacilos con dominio P-Nav10/11) a los 25 dpi. Además, ese valor es significativamente superior a los obtenidos con los sueros de 25 dpi de los grupos control ($p=0,002$), grupo 1 ($p=0,002$) y grupo 2 ($p=0,031$), según el test de Tukey. En el caso de los sueros obtenidos a los 64 dpi las densidades ópticas obtenidas frente a VLPs de RHDV-Nav10/11, no muestran

diferencias significativas entre los distintos grupos de conejos, según el test Kruskal-Wallis ($p=0,265$). Además, en ningún grupo se supera el punto de corte de la técnica, indicando que no se han producido anticuerpos frente a la nueva variante en los conejos tratados oralmente con los lactobacilos recombinantes.

En cuanto a la presencia de anticuerpos frente a VLPs de RHDV-Ast89 (**Figura 37B**), en todos los grupos y tiempos de muestreo los valores superan el punto de corte del ELISA. Curiosamente, en el grupo control (tratados con lactobacilos no recombinantes), la densidad óptica parece aumentar en los sueros 64 dpi, sin embargo, las diferencias no son significativas con respecto a los sueros de los 25 dpi. En el grupo de conejos tratados con lactobacilos EM322 (PdomAst89-Histag) (grupo 1) se mantienen iguales los valores obtenidos en los sueros de 25 dpi y 64 dpi, siendo similares a los del grupo control. Los

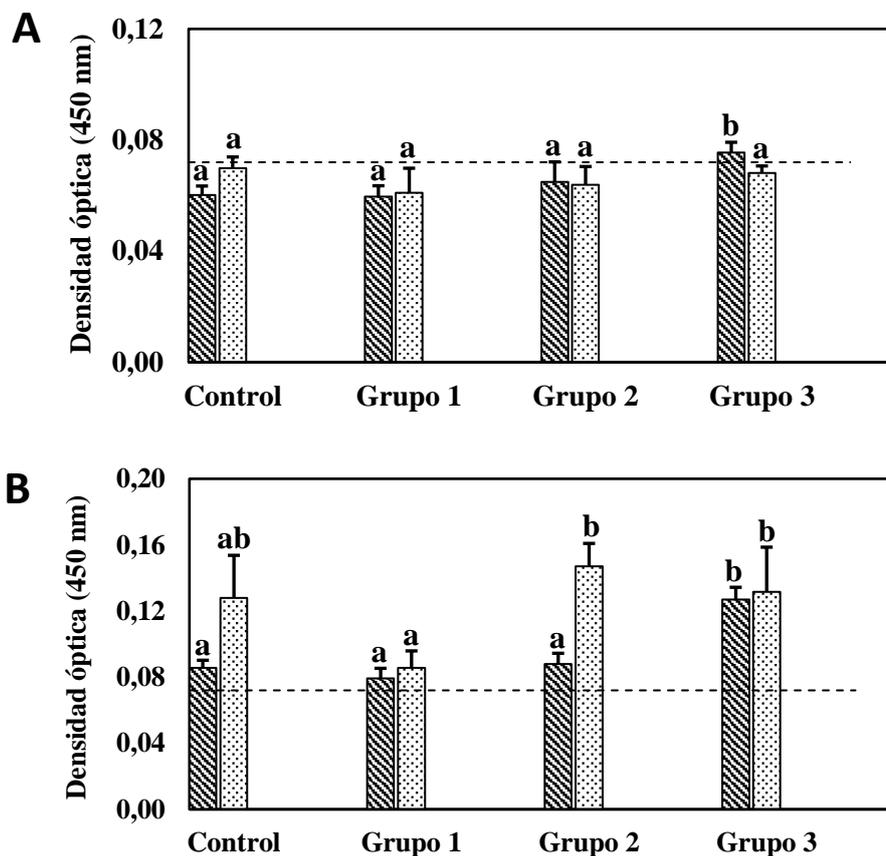


Figura 37. Análisis ELISA de la presencia de anticuerpos frente a distintos tipos de RHDV en sueros de conejos tratados oralmente con lactobacilos recombinantes. **A.** Media y desviación estándar obtenidas frente a VLPs de RHDV-Nav10/11. **B.** Media y desviación estándar obtenidas frente a VLPs de RHDV-Ast89. Los sueros analizados se tomaron a los 25 (rayas) y 64 (puntos) días tras la primera administración. Letras distintas indican diferencias significativas entre los valores.

sueros de los animales pertenecientes al grupo 2 (EM324, PdomAst89) muestran un aumento de la densidad óptica a los 64 dpi con respecto a los 25 dpi. Los sueros del grupo 3 (EM328, PdomNav10/11) muestran valores similares a los 25 dpi y 64 dpi. Con respecto a los análisis estadísticos, según el test de Tukey, comparando los resultados a 25 dpi (barras rayadas, **Figura 37B**) entre los distintos grupos, se observa que el valor de densidad óptica del grupo 3 es significativamente superior a los del resto de grupos con $p < 0,001$. Para la densidad óptica obtenida en los sueros de 64 dpi (barras punteadas) el test de Tukey indica que los valores de los grupos 2 y 3 son significativamente superiores al del grupo 1 con $p = 0,005$ y $p = 0,034$, respectivamente.

Posteriormente, para comprobar si en función del antígeno vacunal que expresaba el lactobacilo había diferencias en la producción de anticuerpos frente a los dos tipos de VLPs, se tomaron para cada grupo los resultados conjuntos obtenidos de los dos tiempos de muestreo (25 y 64 dpi) en el ELISA con VLPs de RHDV-Nav10/11 y se compararon con los del ELISA con VLPs de RHDV-Ast89. De este modo los resultados de las medias y las desviaciones estándar obtenidas (**Tabla 22**) permiten observar que los valores obtenidos en todos los grupos utilizando un ELISA frente a VLPs de RHDV-Ast89 son significativamente superiores a los obtenidos en un ELISA frente a VLPs de RHDV-Nav10/11.

Tabla 22. Análisis de la producción de anticuerpos frente a distintos RHDV en suero tras la administración oral de lactobacilos recombinantes.

	VLPs RHDV-Nav10/11	VLPs RHDV-Ast89	P-valor
Control	0,060±0,003	0,086±0,005	0,006
Grupo 1	0,060±0,004	0,079±0,006	0,011
Grupo 2	0,065±0,007	0,088±0,007	0,004
Grupo 3	0,076±0,003	0,127±0,007	0,002

Los valores mostrados indican media de $DO \pm SD$ obtenidos en todos los sueros de un mismo grupo de animales, frente a un tipo determinado de VLP.

Para el estudio de colonización del intestino las muestras de heces se hidrataron y resuspendieron en PBS, para poder sembrar diferentes volúmenes (100 μ l y 200 μ l) en placas de medio MRS Broth con eritromicina para aislar lactobacilos recombinantes. Una vez tituladas las muestras de heces se comprobó mediante PCR con los cebadores att1 y att7 que las colonias correspondían a lactobacilos recombinantes. Las muestras de

intestino delgado, una vez eliminadas las heces que contenían, se rascaron sus paredes internas y con PBS se resuspendieron para seguir el mismo procedimiento que con las muestras de heces. Los títulos de lactobacilos obtenidos tras 24 horas desde la primera administración (**Tabla 23**) muestran que todos los animales defecaron una cantidad importante de bacterias por gramo de heces, siendo superior en el grupo 1. Después de 24 horas tras la segunda administración, el título de bacterias en heces baja en el grupo 1 (**Tabla 23**), y en los otros dos grupos no fue posible aislar ninguna bacteria, por problemas sobrevenidos de contaminaciones por hongos. En el caso de las secciones de intestino delgado no se obtuvieron colonias de lactobacilos recombinantes de ningún animal, lo que indica que las bacterias podrían no estar colonizando esta zona del intestino de los conejos.

Tabla 23. Cuantificación de lactobacilos recombinantes en heces de conejos tratados oralmente.

Momento de muestreo	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
1ª inmunización	$8,9 \times 10^8$ ufc/g	$2,27 \times 10^8$ ufc/g	$2,72 \times 10^8$ ufc/g
2ª inmunización	$2,31 \times 10^8$ ufc/g	-	-

Los resultados de las titulaciones están expresados en medias de unidades formadoras de colonias por gramo de heces analizadas.

Para evaluar la protección frente al virus, pasados 39 días desde la segunda administración (día 64 del experimento) los animales se inocularon con RHDV-Gal08/13, y que causa 100 % de mortalidad en conejos adultos. El reto viral se realizó inyectando por vía subcutánea una dosis por animal de aproximadamente 10 veces la dosis letal 50 (DL50). Tras la inoculación del virus el estado de los conejos se comprobó diariamente. Durante las primeras 24 horas post-inoculación (hpi) en las que no se encontró ningún animal con síntomas de enfermedad. Como puede observarse en la **Figura 38**, entre las 24 y 36 hpi murieron todos los animales de los grupos control, y vacunados oralmente con lactobacilos que expresaban dominios P de RHDV-Ast89 o RHDV-Nav10/11. Sin embargo, el 50 % del grupo de animales tratados con lactobacilos que producían dominios P de RHDV-Ast89 con cola de histidinas sobrevivió hasta las 48 horas después de la inoculación del virus.

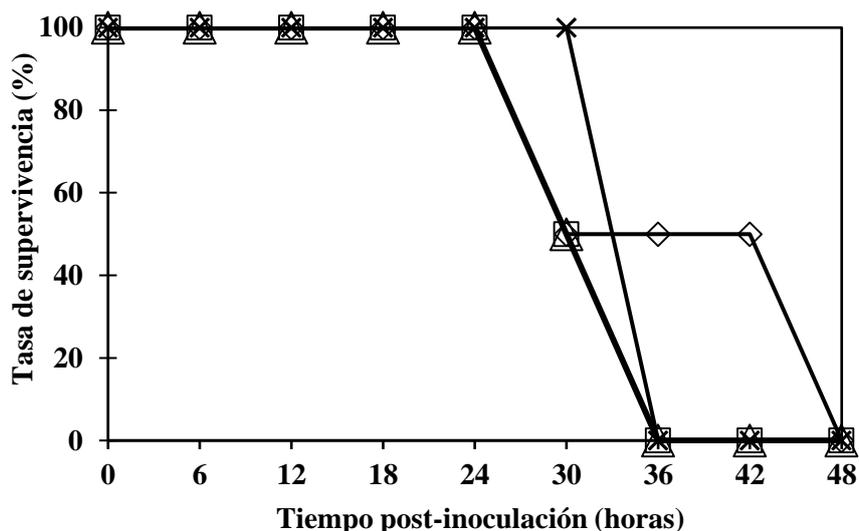


Figura 38. Supervivencia frente a RHDVb (Gal08/13) después de la administración oral de distintos tipos de lactobacilos recombinantes que expresan, anclados a la pared, distintos dominios P: DomPAst89-Histag (rombos), DomPAst89 (cuadrados), DomPNav10/11 (triángulos). Grupo tratado con lactobacilo silvestre (cruces).

4.4.3. Evaluación de la eficacia de vacunación con VLPs y dominios P de RHDV-Nav10/11

La elevada capacidad inmunogénica de las VLPs frente a al virus clásico de RHDV ya ha sido comprobada anteriormente en otros estudios (Boga *et al.*, 1997; Pérez-Filgueira *et al.*, 2007; Plana-Duran *et al.*, 1996). Sin embargo, en el presente trabajo nos planteamos estudiar la capacidad de inducir protección frente a un aislado de la nueva variante (RHDV-Gal08/13) del virus que provoca el 100 % de mortalidad en gazapos, y a la vez, estudiar posibles diferencias provocadas por las distintas estrategias de producción de las VLPs.

Teniendo en cuenta que en estudios previos se identifica el dominio P de la proteína VP1 de RHDV como una región antigénica importante y más expuesta al exterior de la cápsida del virus (Leuthold *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2013), en este trabajo se ha planteado a este dominio P como un candidato vacunal frente a la nueva variante del virus. Para esto, se ha evaluado la capacidad del dominio P de RHDV-Nav10/11 fusionado con GST (GST-P) de inducir una respuesta inmune protectora frente a un desafío viral letal.

La evaluación de la eficiencia vacunal de las VLPs de RHDV-Nav10/11 purificadas o presentes en extractos de crisálidas, así como de los dominios P de RHDV-Nav10/11

fusionados con GST (GST-P), se realizó simultáneamente en un único experimento empleando conejos de 29 días de edad. Como aparece esquematizado en la **Figura 39**, se establecieron un total de 9 grupos experimentales con 4 animales por cada uno de ellos. Para la vacunación con VLPs se utilizaron 4 grupos de gazapos que se inmunizaron con VLPs de RHDV-Nav10/11 procedentes de distintas estrategias de expresión y en presencia o ausencia de adyuvante (AlOH₃). Los grupos 1 y 2 se vacunaron con VLPs purificadas a partir de cultivos celulares de insecto, en presencia o ausencia de adyuvante, respectivamente. Los grupos 3 y 4 se inmunizaron con extractos de crisálidas que expresan VLPs, en presencia o ausencia de adyuvante. Se emplearon en todos los casos dosis de 5 µg de VLPs por animal. Los grupos 5, 6 y 7 se emplearon para estudiar la inmunización con la fusión del dominio P y GST (GST-P) en distintas dosis: 10 µg de GST-P/animal y 100 µg de GST-P/animal, ambos en presencia de adyuvante (grupos 5 y 6, respectivamente), y 100 µg de GST-P/animal sin adyuvante (grupo 7). Los animales controles utilizados se dividieron en dos grupos: uno al que se le administró PBS (control 1) y otro al que se le inyectó una mezcla de PBS y la solución adyuvante de AlOH₃ (control 2) (**Figura 39**). Los antígenos se administraron en un volumen final de 0,5 mL/animal por vía subcutánea.

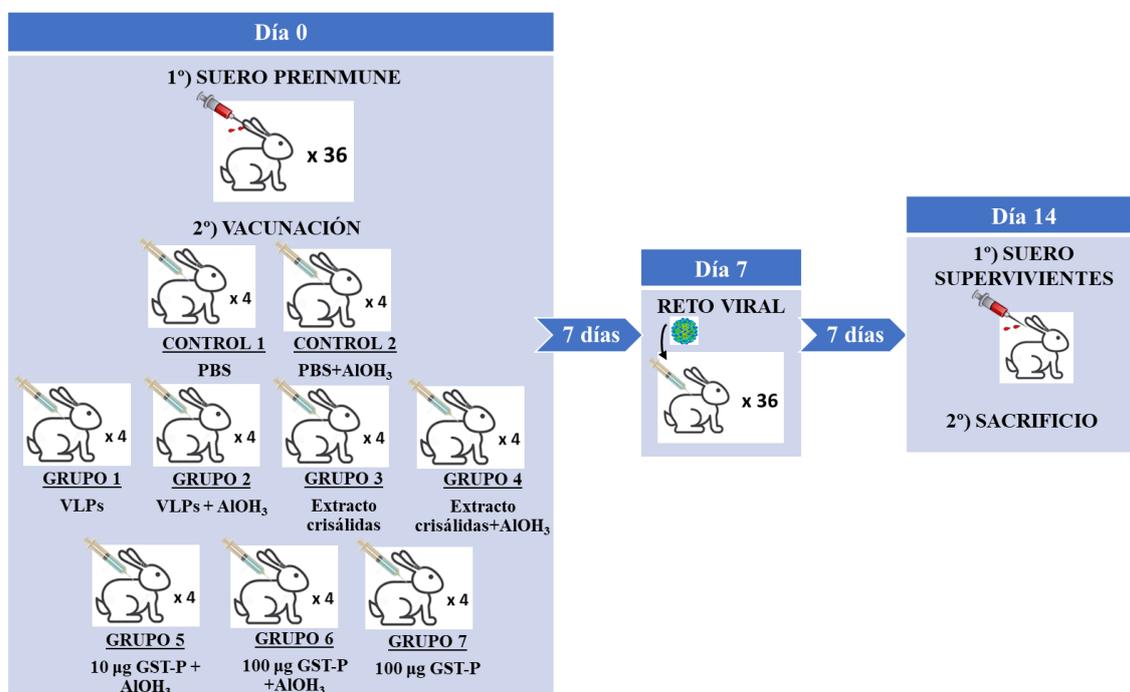


Figura 39. Esquema del diseño experimental para el estudio de la eficacia vacunal, frente a RHDVb, de tratamientos con VLPs o la proteína de fusión GST-dominio P.

Previamente a la inmunización se tomaron muestras de sangre de todos los animales para comprobar la ausencia de anticuerpos frente a RHDV. Los sueros obtenidos de estas muestras se analizaron mediante ELISA (sistema comercial de INGENASA), dando resultados negativos en todos los casos.

Después de la muerte, o sacrificio, de los animales se tomaron muestras de hígado para un posterior análisis por RT-PCR para comprobar la presencia del virus RHDV y realizar una cuantificación del número de copias de ARN viral.

Para evaluar la protección frente al virus, pasados 7 días desde la vacunación los animales se inocularon con RHDV-Gal08/13 por vía subcutánea con una dosis por animal de aproximadamente 10 veces la dosis letal 50 (DL_{50}). Tras la administración del virus se comprobó diariamente el estado general de los animales. Los resultados de supervivencia de los animales se muestran en la **Figura 40**. Durante las primeras 24 horas (día 1 del reto) post-infección no se encontró ningún síntoma de enfermedad en los conejos. Entre los días 1 y 3 tras el reto se produjo la muerte de todos los animales de grupos controles (PBS y PBS+ady) (**Figura 40A**). En el caso de la vacunación con VLPs, se observa que en los grupos tratados con VLPs purificadas y extractos de crisálidas sin adyuvante la tasa de supervivencia se reduce al 0 % el día 3, similar a lo ocurrido con los grupos controles. Sin embargo, en presencia de adyuvante, los animales vacunados con extractos de crisálidas mantienen una tasa de supervivencia del 50 % desde el día 4 tras la infección hasta el final del experimento (3 días después), y en los animales vacunados con VLPs purificadas la tasa de supervivencia fue del 100 % a los 7 días desde el desafío (**Figura 40B**). Al analizar las tasas de supervivencia de los gazapos vacunados con la fusión GST-dominio P de RHDV-Nav10/11, puede observarse (**Figura 40C**) que, al igual que ocurría en los grupos controles, la supervivencia de los conejos inmunizados con 10 μ g de GST-P con adyuvante se reduce hasta 0 % a los 3 días después de la infección. La vacunación con 100 μ g de GST-P en presencia de adyuvante retrasa la muerte de todos los animales hasta el día 5 post-infección y, curiosamente, la inmunización con esa misma dosis de GST-P en ausencia de adyuvante produce la supervivencia del 50 % de animales desde el cuarto día post-inoculación del virus hasta el final del experimento (3 días después).

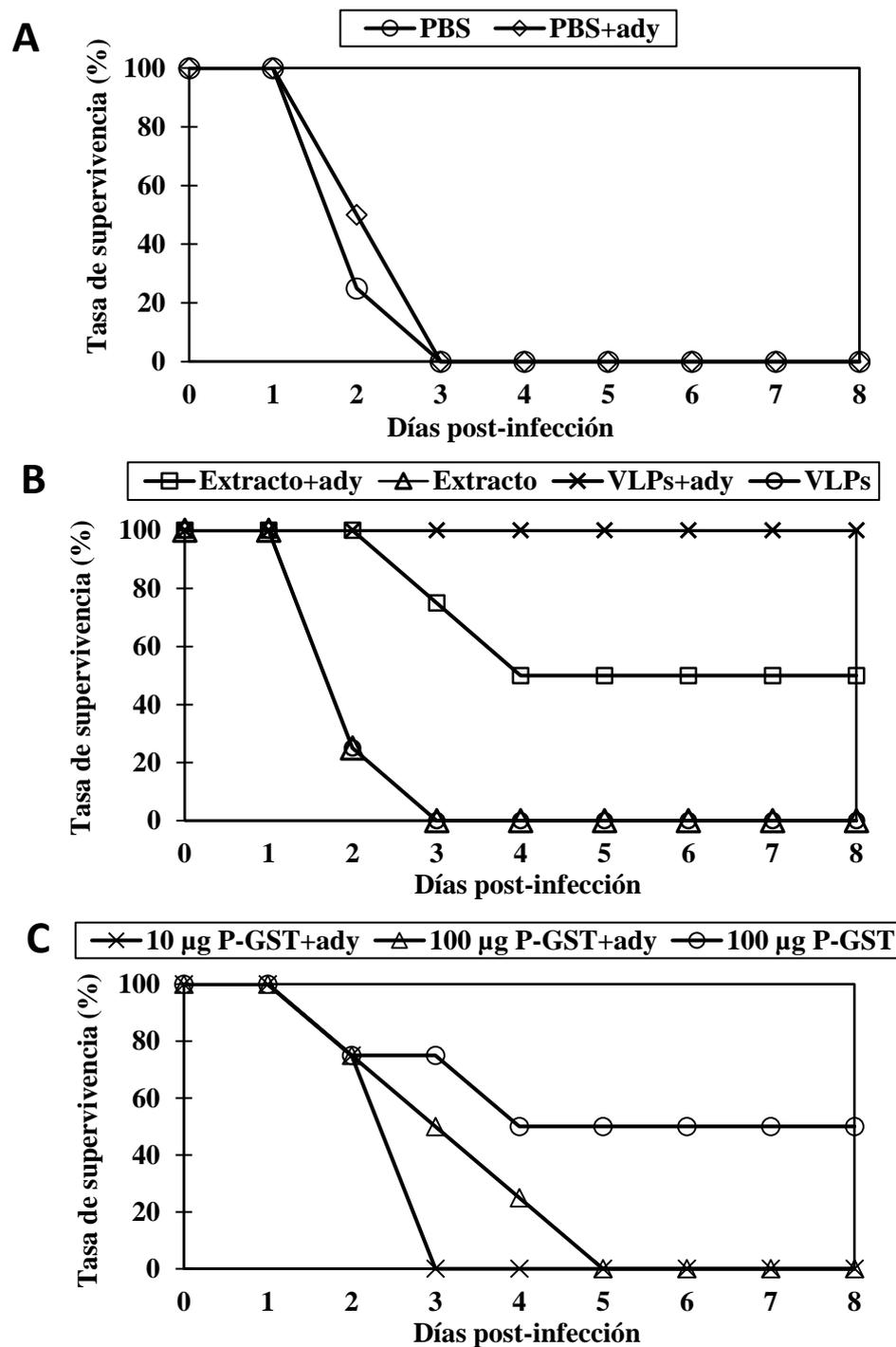


Figura 40. Supervivencia de conejos frente a RHDVb tras la vacunación con VLPs o GST-dominio P. **A.** Animales control. **B.** Animales tratados con VLPs purificadas y extractos de crisálidas, en presencia o ausencia de adyuvante. **C.** Animales tratados con distintas dosis de la fusión GST- dominio P (GST-P) en presencia o ausencia de adyuvante. El tiempo 0 corresponde al momento de la inoculación del RHDVb.

Para comprobar si los animales supervivientes habían producido anticuerpos frente a RHDV se les tomaron muestras de sangre y los sueros se analizaron mediante ELISA (Tabla 24). Los valores positivos en ELISA obtenidos de los sueros de los dos animales

supervivientes que habían sido vacunados con 100 µg de GST-P en ausencia de adyuvante, demuestran la producción de anticuerpos frente a RHDV. Sin embargo, hay que indicar que los valores obtenidos son cercanos al punto de corte del método, lo que muestra un título bajo de anticuerpos.

Tabla 24. Análisis de la presencia de anticuerpos frente a RHDV en animales supervivientes mediante ELISA comercial (INGENASA).

Grupo experimental	Animal superviviente*	Suero 1 (día 0 del experimento)	Sueros 2 (fin del experimento)
Extracto+ady	9	0,083	0,234
	12	0,077	2,775
VLPs+ady	17	0,063	1,146
	18	0,067	0,396
	19	0,068	2,259
	20	0,067	2,439
100 µg GST-P	33	0,068	0,331
	36	0,087	0,319

* Identificación individual del animal superviviente. El punto de corte del ELISA determinado por el fabricante es de 0,3.

Como ya se había descrito en otros trabajos las diferencias antigénicas existentes entre las cápsidas del virus clásico RHDV y la nueva variante pueden generar diferencias en la producción de anticuerpos específicos (Bárcena *et al.*, 2015). Además, sabemos que los antígenos utilizados en el tapizado del ELISA Ingenasa para la detección de anticuerpos son VLPs de RHDV clásica. Por tanto, se procedió a realizar una detección de anticuerpos más específica frente a la nueva variante del virus y, para ello, se llevó a cabo un ELISA dónde los antígenos utilizados por separado fueron 100 ng de VLPs de la nueva variante (RHDV-Nav10/11) y VLPs de clásica (RHDV-Ast89).

En la **Tabla 25** pueden observarse los valores en densidad óptica de los sueros de conejos supervivientes vacunados con extractos de crisálidas, VLPs purificadas o GST-dominio P cuando se enfrentan a los dos tipos de VLPs separadamente. En todos los sueros analizados se superó el punto de corte del ensayo de ELISA. En los animales supervivientes vacunados con extractos de crisálidas (9 y 12), la cantidad de anticuerpos en el suero del animal 12 es claramente superior al del animal 9. En el caso del análisis estadístico para un mismo suero frente a distintas VLPs, en el suero 9 la densidad óptica obtenida frente a VLPs de RHDV-Ast89 es significativamente mayor que frente a VLPs de RHDV-Nav10/11 ($p < 0,001$ por T de Student). Sin embargo, en el suero 12 no existen

diferencias significativas entre las distintas VLPs ($p=0,585$, test de Welch). En el caso de los animales vacunados con VLPs purificadas los sueros presentan anticuerpos frente a ambos tipos de VLPs, pero los animales 18 y 19 la cantidad de anticuerpos en suero frente a VLPs de RHDV-Nav10/11 es significativamente mayor que frente a VLPs de RHDV-Ast89 ($p<0,001$ y $p=0,001$, respectivamente por test T-Student). Sin embargo, en los animales 17 y 20, los niveles de anticuerpos en suero frente a ambas VLPs no presentan diferencias significativas ($p=0,1$, en ambos por el Test Wilcoxon). Los sueros de los animales supervivientes vacunados con GST-P contienen anticuerpos frente a los dos tipos de VLPs, pero, en ambos sueros (33 y 36) existe una diferencia muy significativa de densidades ópticas, siendo mayor frente a VLPs de RHDV-Nav10/11 que a VLPs de RHDV-Ast89 ($p<0,001$, para ambos sueros, por el test T-Student). Esto refleja, como era de esperar, que los conejos que se vacunaron con dominios P de la nueva variante presentan mayores cantidades de anticuerpos específicos frente a ella.

Tabla 25. Presencia de anticuerpos frente a VLPs de distintos RHDV en animales supervivientes a un desafío con RHDVb y previamente tratados con VLPs o GST-P.

Grupo experimental	Animal	VLPs RHDV-Nav10/11		VLPs RHDV-Ast89	
		Media*	SD*	Media*	SD*
Extracto+ady	9	0,36	0,02	0,59	0,01
	12	2,84	0,11	2,80	0,01
VLPs+ady	17*	3,03	3,03-3,08	2,13	2,10-2,15
	18	1,88	0,09	0,34	0,04
	19	3,52	0,09	2,72	0,15
	20*	3,50	3,49-3,65	2,98	2,92-3,10
100 µg GST-P	33	0,95	0,03	0,24	0,01
	36	2,48	0,06	0,41	0,01

El valor del punto de corte del ELISA es 0,132. *Los valores de densidad óptica en los sueros 17 y 20, se expresan en mediana y rango intercuartílico, debido a que los datos no siguen la normalidad.

Los resultados muestran, una cierta especificidad frente a VLPs de la nueva variante de los anticuerpos presentes en el suero de algunos animales, concretamente, en los vacunados con el dominio P fusionado con GST, y en dos de los vacunados con VLPs de la nueva variante. Esto sugeriría, nuevamente la existencia de diferencias antigénicas entre la nueva variante RHDVb y el RHDV clásico (Bárcena *et al.*, 2015).

La posible utilidad del antígeno vacunal marcado en forma de fusión GST-P se evaluó mediante la determinación de la presencia de anticuerpos mediante ELISA frente a la proteína GST en sueros de los conejos supervivientes vacunados con dicha fusión. La

proteína GST utilizada se purificó a partir de extractos inducidos de bacterias BL21 transformadas con el vector pGex-2T vacío. La presencia de anticuerpos en suero se determinó tapizando los pocillos de la placa de ELISA con 100 ng de GST, siendo la misma cantidad de antígeno que se emplea con las VLPs. Como controles para la presencia de anticuerpos específicos frente GST, se analizaron a la vez los sueros del resto de animales supervivientes de experimento que habían sido vacunados con otros antígenos y un suero de conejo disponible comercialmente, en el que no se esperaba ver presencia de anticuerpos frente a la GST. Los resultados obtenidos mostraron en los animales supervivientes vacunados con GST-P la ausencia de anticuerpos frente a la proteína GST, ya que los valores obtenidos de densidad óptica se encuentran por debajo del punto de corte de la técnica (datos no mostrados). Los mismos resultados se obtuvieron con los sueros del resto de animales supervivientes y el suero comercial empleado.

A partir de las muestras de hígado tomadas de los animales muertos o sacrificados, se investigó el número de copias de ARN de RHDV-Gal08/13 mediante PCR cuantitativa a tiempo real (**Figura 41**).

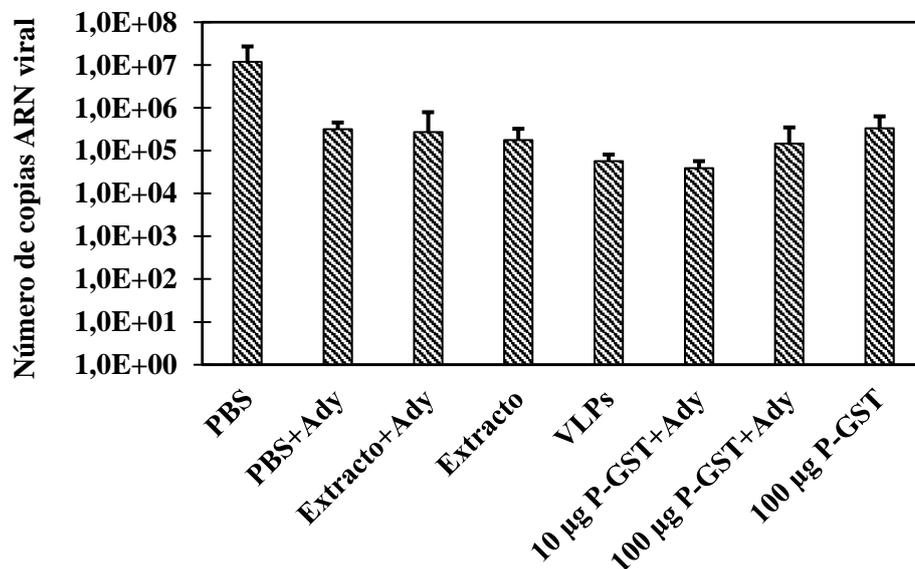


Figura 41. Cuantificación del número de copias de ARN viral en muestras de hígado mediante RT-PCR.

En los hígados de los 4 conejos supervivientes vacunados con VLPs purificadas con adyuvante no se detecta ARN viral, lo que confirma una protección total frente al virus. Lo mismo ocurrió en uno de los supervivientes vacunado con 100 µg de GST-P sin adyuvante, identificado con el número 36. Para el resto de los animales, dónde se detectó

presencia de ARN de RHDV-Gal08/13, los resultados del número de copias de ARN cuantificadas se muestran en la **Figura 41**. Los animales control inoculados solo con PBS tienen la mayor carga viral ($1,18 \times 10^7$ copias de ARN viral/mg). Sin embargo, la menor carga viral la mostraron los animales vacunados con VLPs sin adyuvante o con 10 μ g de GST-P con adyuvante, reduciéndose en torno a 1000 veces con respecto a los animales control (PBS solo). En las muestras de hígado de los demás animales muertos, el número de copias de ARN viral fue unas 100 veces menor que en el control de PBS. En los animales número 9 y 12, supervivientes del grupo inmunizado con extractos de crisálidas que contenían VLPs, la cantidad de ARN viral fue de 11,8 y 789 copias/mg, muy inferior a la que tenían los animales muertos. El animal 33 superviviente vacunado con 100 μ g de GST-P sin adyuvante tenía $3,1 \times 10^4$ copias de ARN/mg de hígado.

Discusión

5. DISCUSIÓN

Desde el año 2011, en que se detectan los primeros casos de enfermedad hemorrágica del conejo debido a la nueva variante del virus (RHDVb), la falta de herramientas diagnósticas específicas y rápidas, y la carencia de vacunas eficaces ha dificultado el control y seguimiento de la enfermedad causada por este virus tanto en granjas como en poblaciones salvajes de conejo.

La protección parcial frente a la nueva variante que confieren las vacunas basadas en el virus RHDV clásico, hacían necesaria la generación de nuevas vacunas más específicas y eficientes frente a este nuevo virus. A su vez, la tecnología basada en la producción de partículas similares al virus mediante baculovirus recombinantes abren muchas posibilidades, junto con otras estrategias de expresión que se han planteado y estudiado en el presente trabajo, para la producción de una vacuna que evite la infección experimental de conejos como se viene haciendo hasta la actualidad.

El estudio de las características antigénicas del virus de la enfermedad hemorrágica del conejo se encuentra limitado por su incapacidad para propagarse en cultivos celulares. Como consecuencia, los estudios realizados se basan en proteínas virales expresadas utilizando distintos sistemas heterólogos, bien en células eucariotas o procariotas.

5.1. CARACTERIZACIÓN ANTIGÉNICA DE LA PROTEÍNA PRINCIPAL DE LA CÁPSIDA DE RHDV

Tras la aparición de la nueva variante del virus RHDV, en 2011 (Le Gall-Reculé *et al.*, 2011a), este nuevo virus se expandió rápidamente por España (Dalton *et al.*, 2014; Dalton *et al.*, 2012), el resto del continente europeo (Abrantes *et al.*, 2013; Baily *et al.*, 2014; Duarte *et al.*, 2015; Le Gall-Reculé *et al.*, 2013; Puggioni *et al.*, 2013; Simpson *et al.*, 2014; Westcott *et al.*, 2014) y otras partes del mundo (Hall *et al.*, 2015; OIE, 2016), sustituyendo al virus clásico (Calvete *et al.*, 2014; Lopes *et al.*, 2015a; Mahar *et al.*, 2018). La aparición de virus recombinantes cuyos genomas incluyen secuencias de proteínas no estructurales de RHDV-G1 (clásico) o no patogénicos (RCV), fusionadas con regiones codificadoras de proteínas estructurales de RHDVb (Lopes *et al.*, 2015b) indican un aumento en la complejidad de los virus circulantes en la península Ibérica. La existencia de estos virus recombinantes hace pensar que los virus parentales han estado co-circulando en el campo y/o granjas. En estas circunstancias, el desarrollo de herramientas

diagnósticas específicas para determinar qué virus produce un determinado brote supone una ayuda básica para granjeros o veterinarios a la hora de tomar una decisión sobre el tipo de vacuna a administrar a los animales. La cápsida viral no envuelta de RHDV está formada por la unión de dímeros de la proteína VP1 que, por tanto, es probablemente el principal determinante de la patogenicidad y antigenicidad viral. Debido a esto las nuevas herramientas diagnósticas diseñadas para la inmunodetección del virus usan como diana la proteína VP1 del virus (Bárcena *et al.*, 2015; Dalton *et al.*, 2017; Dalton *et al.*, 2018c). En consecuencia, uno de los principales objetivos de este trabajo ha sido el estudio de las regiones antigénicas de la proteína VP1 de RHDVb con el objeto de aportar información y herramientas aplicables en el diagnóstico específico y para el diseño y obtención de vacunas efectivas frente a este virus.

Como una de las herramientas para el estudio de la estructura antigénica de la proteína mayoritaria de la cápsida del RHDV, en el presente estudio se ha generado una batería de anticuerpos monoclonales de ratón utilizando como antígenos dos tipos diferentes de VP1 de RHDV. En una de las inmunizaciones se utilizaron VLPs de RHDVb (aislado RHDV-Nav10/11) y en la segunda VLPs de RHDV clásico (RHDVa o RHDV-G6). La caracterización de los anticuerpos monoclonales obtenidos permite constatar que sus distintas especificidades están relacionadas con el tipo de antígeno utilizado en la inmunización de los ratones. De este modo, puede observarse que varios de los anticuerpos generados frente a RHDVb (RHDV-Nav10/11), 3A10 y 8E10, reconocen al RHDV clásico (RHDV-Ast89) e incluso al RHDVa, un subtipo antigénico del RHDV clásico (**Tabla 8**, **Figura 10** y **Figura 11**). Al estudiar los anticuerpos monoclonales generados frente a las VLPs de RHDVa, no se obtienen anticuerpos capaces de reconocer diferencialmente a las VLPs de RHDVb como cabía esperar (**Figura 7** y **Figura 8**) y varios de ellos (30, 51, 78 y 82) reconocieron tanto al RHDV-G1 como al subtipo antigénico RHDVa (**Figura 8**). Partiendo de los hibridomas 30, 51 y 78 no fue posible obtener subclones estables en varias etapas de aislamiento. El 82 permitió obtener subclones que reconocen un epítipo conformacional de RHDV-G1 y RHDVa ausente en RHDVb. El potencial inmunodiagnóstico de este anticuerpo monoclonal está actualmente en estudio en nuestro laboratorio.

Estos resultados aportan pruebas adicionales de las diferencias antigénicas existentes entre la nueva variante del virus y el RHDV clásico (Bárcena *et al.*, 2015; Dalton *et al.*,

2012) y, por otro lado, explican la falta de protección de las vacunas de RHDV clásico frente a la enfermedad causada por el RHDVb (Bárcena *et al.*, 2015; Dalton *et al.*, 2014).

La caracterización posterior de las regiones reconocidas por los anticuerpos monoclonales 3A10 y 8E10, que reaccionan frente a todos los tipos de VLPs utilizadas en este estudio (RHDV-G1, RHDV-G6 o RHDVb), ha permitido demostrar que éstos reaccionan con una secuencia lineal de aminoácidos presente en el dominio S de la proteína VP1 (**Figuras 10-12**). Mediante análisis de secuencias y alineamientos múltiples se ha observado que el dominio S de la proteína VP1 es una región muy conservada en todos los tipos de RHDV analizados (**Figura 3B** y **Figura 4**) que presenta un 100 % de homología entre los aislados G1 y G6 del RHDV clásico y un 98,8 % entre estos virus y el RHDVb. Este elevado grado de similitud explica que estos anticuerpos puedan reconocer a varios tipos de RHDV. Adicionalmente este alto grado de conservación de secuencia sugiere un papel estructural relevante del dominio S y justifica que la estructura tridimensional del dominio S de RHDV sea muy similar a la observada en otros calicivirus (Wang *et al.*, 2013). En este trabajo se ha podido comprobar que el epítipo reconocido por los anticuerpos monoclonales 3A10 y 8E10 incluye la Pro201 de la proteína VP1 (**Figura 12**) que al ser sustituida por Leu impide la unión de estos anticuerpos.

Cuando se caracterizaron los anticuerpos obtenidos frente a las VLPs de RHDVb se obtuvo un solo monoclonal que reaccionó específicamente con dichas VLPs y no con el resto de tipos de VLPs de RHDV. Este anticuerpo, nombrado como 2D9, resultó reconocer un epítipo conformacional puesto que únicamente reacciona frente a la proteína VP1 (ensambladas en VLPs) o el dominio P completo de RHDVb en sus estados conformacionales nativos (**Figura 11** y **Figura 13**) y no cuando se encuentran desnaturalizados (**Figura 10**). Por esto mismo es por lo que tampoco reacciona con fragmentos del dominio P de RDHVb fusionados a GST que parecen no adquirir la estructura necesaria para la unión del anticuerpo 2D9 (**Figura 11**).

5.2. ANÁLISIS DE LA REACTIVIDAD DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL ESPECÍFICO Y NEUTRALIZANTE DE LA NUEVA VARIANTE DEL RHDV, Y DESARROLLO DE HERRAMIENTAS DIAGNÓSTICAS

Para demostrar la capacidad neutralizante del anticuerpo 2D9 fue necesario realizar ensayos “*in vivo*”, infectando conejos con una dilución del virus RHDV-Gal08/13

previamente incubado con anticuerpos. En este tipo de ensayos, se comprobó que este anticuerpo es capaz de neutralizar al virus y evitar la muerte de los animales infectados experimentalmente (**Figura 14**). Además, la ausencia de cantidades detectables de genoma viral en el hígado de los conejos inoculados con el virus tratado con 2D9, indica que, el RHDVb no es capaz de llegar a infectar a las células de conejo, o que no puede replicarse en ellas y se elimina rápidamente sin producir enfermedad (**Tabla 9**). En contraste con estos resultados, en el caso de las incubaciones con el anticuerpo 3A10, que interacciona con el dominio S de RHDV tanto clásico como de la nueva variante, no se obtuvieron resultados que indiquen la capacidad neutralizante de este anticuerpo. Estos resultados apoyan que el dominio P de la proteína VP1 de RHDV, y, más concretamente, el subdominio P2 contiene epítomos neutralizantes y está implicado en la interacción con receptores celulares del hospedador (Bhella *et al.*, 2008; Kong *et al.*, 2016), al igual que ocurre en otros calicivirus (Bhella y Goodfellow, 2011; Chen *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2008; Katpally *et al.*, 2008; 2010; Kolawole *et al.*, 2014; Lochridge y Hardy, 2007; Lochridge *et al.*, 2005; Ossiboff *et al.*, 2010; Prasad, *et al.*, 1999; Shanker *et al.*, 2014; Smith, 2011; Tan *et al.*, 2004a; Taube *et al.*, 2010; Tohya *et al.*, 1997).

Debido a la especificidad y capacidad para neutralizar a RHDVb del anticuerpo monoclonal 2D9, unido a su potencial uso en distintas técnicas de diagnóstico, en esta tesis se ha invertido mucho esfuerzo en la localización y el estudio detallado del epítomo que reconoce, dentro del dominio P de la proteína VP1. En estudios previos sobre la estructura cristalina del dominio P de la VP1 del RHDVb realizados por Leuthold (2016), se ha comprobado que el dominio P expresado en *E. coli* como fusión con la proteína MBP y dotado de una cola de histidinas, es capaz de formar dímeros tanto en los extractos bacterianos como una vez purificado.

Otros laboratorios y trabajos, han estudiado la importancia del dominio P de la proteína VP1 como región antigénica en muchos calicivirus, siendo una zona que contiene numerosos epítomos neutralizantes (Katpally *et al.*, 2008; Kolawole *et al.*, 2014; Lochridge y Hardy, 2007; Smith, 2011; Tohya *et al.*, 1997), estando implicada así mismo en la unión de los viriones a receptores celulares y a antígenos de los grupos sanguíneos (HBGAs) de los glóbulos rojos (Bhella y Goodfellow, 2011; Chen *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2008; Katpally *et al.*, 2010; Lochridge *et al.*, 2005; Ossiboff *et al.*, 2010; Prasad *et al.*, 1999; Shanker *et al.*, 2014; Tan *et al.*, 2004b; Taube *et al.*, 2010). Estudios similares

demuestran la importancia de este dominio en el RHDV (Leuthold *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2013).

La técnica de *docking* o acoplamiento computacional consiste en el modelaje de estructuras e interacciones entre proteínas mediante una herramienta informática que permite hacer una aproximación estructural de este tipo de complejos, por ejemplo, en el caso de los complejos antígeno-anticuerpo. Esta técnica *in silico* se ha utilizado en el estudio de la cápsida (Bhella *et al.*, 2008; Bhella y Goodfellow, 2011) o de la proteasa del calicivirus felino (Yokoyama *et al.*, 2017). Con respecto a los estudios sobre RHDV, las herramientas informáticas para el modelaje de estructuras e interacción entre proteínas ha demostrado ser muy útil para la generación de modelos tridimensionales de los dominios de la proteína VP1, así como de la cápsida del virus al completo (Wang *et al.*, 2013).

En este trabajo, gracias a la secuenciación de la fracción variable del anticuerpo monoclonal 2D9 se ha podido obtener un modelo tridimensional de dicha región del anticuerpo (**Figura 15**). Además, se ha comprobado que en la superficie del paratopo del anticuerpo las regiones más expuestas determinantes de complementariedad o CDRs son los CDR-H2, CDR-H3 y CDR-L1, que se encuentran en una región más electronegativa de la molécula y por tanto con mayor probabilidad de establecer interacciones con otra molécula. En la simulación de la interacción entre el dominio P de RHDVb y el anticuerpo 2D9, se han obtenido varios modelos probables para estos complejos antígeno-anticuerpo. Analizando de forma separada el monómero y el dímero de dominio P se obtuvieron modelos cuyos contactos polares entre moléculas se centraban entre los CDR-H2, CDR-H3 y CDR-L1 del anticuerpo y los lazos 1, 3 y 5 del subdominio P2, constatando que los aminoácidos implicados en estas interacciones no son los mismos en ambos modelos (**Tabla 11** y **Tabla 12**). Estos resultados de simulación contrastan con los obtenidos por Leuthold (2016), dónde el modelaje realizado a partir de la estructura cristalina del dominio P mostró las posibles interacciones con 2D9 dentro de los lazos 2, 4 y 5 del subdominio P2, y los CDR del paratopo del anticuerpo formarían una especie de “valle”, de modo que la mayoría de las interacciones se producirían con residuos de los CDR menos expuestos en la superficie del paratopo. Se podría especular que la flexibilidad de los lazos expuestos del dominio P (Katpally *et al.*, 2010; Leuthold *et al.*, 2015; Taube *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013) podría ser la causa de las diferencias de los resultados

obtenidos en distintos tipos de modelajes. Sin embargo, la información aportada por estos modelos ha sido de gran utilidad para poder dirigir el análisis de los lazos más expuestos del subdominio P2.

Para investigar el papel de alguno/s lazos del subdominio P2 en la interacción del anticuerpo 2D9, se diseñaron péptidos sintéticos basados en sus secuencias de aminoácidos individuales (**Tabla 13**) para ser empleados en ensayos ELISA de competición con la interacción del monoclonal con las VLPs de RHDVb. Los resultados obtenidos en los ELISAs mostraron una reducción significativa de la señal en presencia de cualquiera de los péptidos correspondiente a los 5 lazos del subdominio P2 por separado (**Tabla 14**), sugiriendo que la interacción previa de 2D9 con cualquiera de los péptidos impide o dificulta la unión de este anticuerpo a las VLPs completas. La reducción más significativa se produce en presencia de los péptidos correspondientes a los lazos 4 o 5 (TQ8 o IA13, respectivamente) (**Figura 17**), un resultado que confirma las predicciones obtenidas a partir de los modelos obtenidos por *docking* (este trabajo y Leuthold, 2016) indicando su implicación en interacciones relevantes con el paratopo del anticuerpo 2D9. Los porcentajes de reducción de la señal de 2D9 en presencia de péptido/s no son demasiado elevados (el máximo alcanzado se encontraría en torno al 14 %), lo que podría explicarse porque, como ya hemos visto, el anticuerpo monoclonal 2D9 reconoce una conformación o estructura del dominio P, y los péptidos de pequeño tamaño, utilizados en este trabajo, no adquieren estructuras complejas como los lazos de la VP1 a los que corresponden sus secuencias.

El hecho de que el aumento en la cantidad de un péptido o el uso de una mezcla de todos los péptidos se traduzca en una menor reducción de la señal por 2D9, o incluso en algunos casos en el incremento de ésta (**Tabla 14**), podría explicarse considerando que una alta concentración de péptidos podría entorpecer su unión al anticuerpo, disminuyendo con ello su actividad competidora con las VLPs. Por otro lado, cabría la posibilidad de que los propios péptidos unidos a 2D9 se adsorbiesen a zonas de las placas no ocupadas por las VLPs insuficientemente bloqueadas, dando lugar a una señal positiva que, en realidad, no corresponde a la unión del anticuerpo a las VLPs de RHDVb.

Durante el desarrollo de esta tesis se caracterizaron varios aislados de campo de RHDVb que no reaccionaban con 2D9. Tras la secuenciación de la VP1 de estos mutantes naturales sus secuencias se utilizaron como base para diseñar mutantes puntuales del

dominio P de RHDV-Nav10/11 (RHDVb) para intentar mapear el epítopo del anticuerpo 2D9. Uno de los aislados mutantes naturales, RHDV-Ger06/12-2, contenía un único cambio en posición 387 de la secuencia de VP1 (**Figura 18C** y **Figura 18D**), a partir del que se diseñó la construcción de dos mutantes diferentes. Una sustitución por un residuo apolar más pequeño (N387A) y otro que conservando el tamaño cambiara su carácter y capacidad de establecer interacciones con otros residuos (N387D). Los resultados obtenidos por Dot blot y ELISA (**Figura 20A** y **Figura 21**, respectivamente) confirmaban que el anticuerpo 2D9 pierde toda la capacidad de unión al mutante N387D, al igual que ocurría con el virus mutante con el mismo cambio. Sin embargo, con el mutante N387A, aunque se reducía significativamente la señal producida por la unión de 2D9, se seguía manteniendo cierta capacidad de interacción. El aminoácido alanina es más pequeño y menos complejo que el ácido aspártico que contiene un grupo ácido en su cadena lateral, estas diferencias podrían estar afectando a la conformación de los lazos o estructura del dominio P necesaria para que sea reconocido por 2D9. Además, hay que indicar que el residuo 387 se encuentra dentro del lazo 4, uno de los posible sitios de interacción con el paratopo de 2D9 (predicho por Leuthold, 2016), lo que explicaría la pérdida o disminución de la interacción en ambos mutantes (N387A y N387D). La relación entre las regiones hipervariables de los lazos expuestos del dominio P de algunos calicivirus y los epítopos neutralizantes ya han sido demostradas en distintos trabajos mediante el estudio de mutantes de escape de anticuerpos neutralizantes (Ossiboff *et al.*, 2010; Tohya *et al.*, 1997).

Otro de los aislados mutantes naturales del virus RHDVb, RHDV-Ler11/16-1, contenía varias mutaciones en la secuencia de VP1, pero se centró el análisis en los cambios presentes en las posiciones T414 y A415, ya que también eran residuos diferenciales entre la VP1 del RHDVb (A414-T415) y la del aislado clásico RDHV-Ast89 (N414 y P415), que no es reconocida por 2D9. Para analizar la influencia de estas mutaciones se construyó el mutante del dominio P AT414-15, manteniendo toda la secuencia de RHDV-Nav10/11, en la que los residuos A414-T415 se sustituyeron por N414-P415 presentes en la secuencia de RHDV-Ast89. Los resultados obtenidos en análisis por Dot blot mostraron que se mantenía la capacidad de interacción del anticuerpo con este mutante de dominio P (**Figura 20A**). Sin embargo, mediante ELISA, se comprobó que la señal se reducía significativamente (**Figura 21** y **Tabla 15**), incluso por debajo de la que presentó el mutante N387A, aunque no desapareció por completo como

ocurrió con N387D. Esto demuestra que los residuos 414 y 415 que se encuentran dentro del lazo 5, aunque influyen en la unión del anticuerpo 2D9 no son los únicos implicados en la falta de reacción del aislado mutante RHDV-Ler11/16-1 o el virus clásico, RHDV-Ast89.

Estos dominios P mutantes puntuales mantienen la capacidad de dimerización, estudiada mediante una electroforesis en condiciones nativas (**Figura 20B**), lo que sugiere que la pérdida total o parcial de interacción de 2D9 en estos mutantes se debe principalmente a la afectación de la región que reconoce el anticuerpo y no a la falta de dimerización del dominio P.

En un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio se habían obtenido VLPs mutantes de RHDV-Nav10/11 en las que se habían sustituido varios residuos de Nav10/11 por los que ocupan la misma posición en el RHDV-Ast89, que no es identificada por el anticuerpo 2D9 (Araujo, 2013). En dicho estudio, los cambios realizados por separado dentro del dominio P afectaban a 4 residuos en las posiciones 307-310 (lazo 1), los residuos 345 y 351 (lazo 2), los residuos 386 y 388 (lazo 4) y los residuos de las posiciones 430-432 fuera de las regiones más expuestas del dominio P. Con respecto a la interacción de esas VLPs mutantes con el anticuerpo 2D9, los análisis se realizaron mediante Dot blot, y todos los mutantes, mostraron interacción positiva con 2D9. Sin embargo, mediante ese tipo de análisis solo es posible detectar cambios muy grandes en la capacidad de unión del anticuerpo, a diferencia de la técnica de ELISA que permite una determinación cuantitativa de la pérdida de interacción. El análisis de los resultados obtenidos con estos mutantes permite constatar el intercambio de dos residuos (368 y 388) en el lazo 4 no son determinantes para la falta de interacción del anticuerpo 2D9, complementando los diferentes resultados obtenidos en esta tesis con los mutantes N387A y N387D. Todo ello podría sugerir que la falta de interacción de 2D9 con el mutante N387D podría deberse a cambios en la conformación tridimensional del lazo 4 o de sus regiones circundantes, más que por pertenecer a la secuencia del epítipo reconocido por este anticuerpo. Esta idea también está apoyada por estudios sobre otros calicivirus y otros virus no envueltos como los picornavirus donde los cambios antigénicos mostrados por las cápsidas de mutantes de escape frente a anticuerpos neutralizantes no tienen por qué ser residuos involucrados directamente en la unión del anticuerpo, pudiéndose encontrar situados en posiciones distantes al epítipo del

anticuerpo (Parry *et al.*, 1990). Todo ello parece sugerir que las mutaciones puntuales pueden provocar cambios o perturbaciones conformacionales en la cápsida del virus que afecten al sitio de unión de anticuerpos neutralizantes (Lochridge y Hardy, 2007; Parry *et al.*, 1990) que reconocen lugares distantes a la localización de la mutación. Por tanto, podría pensarse que el virus mutante aislado RHDV-Ger06/12-2 contiene una mutación puntual en una región que, aunque no esté implicada directamente en la unión del anticuerpo, podría alterar la conformación de un epítipo neutralizante del virus.

Los cambios introducidos de forma puntual en el dominio P de RHDV-Nav10/11 provocaron disminuciones importantes en la interacción de 2D9 con los dominios P mutantes. Para dar explicación a estos resultados podemos apoyarnos en los modelos tridimensionales del dominio P mostrados en la **Figura 42** representando la estructura (modelos a la izquierda) y el potencial electrostático en superficie (modelos a la derecha). Estos modelos tridimensionales muestran que las mutaciones de 1 o 2 residuos aminoacídicos también pueden modificar significativamente la estructura y potencial electrostático de la superficie del dominio P. El modelo del mutante N387A (**Figura 42A**) muestra que la sustitución de la asparagina por el residuo de alanina (A³⁸⁷) provoca un cambio en la superficie del dominio P con respecto a la estructura nativa de Nav10/11. Sin embargo, es aún más llamativo la alteración del potencial electrostático con respecto al dominio P de Nav10/11 que genera esta mutación en las regiones circundantes (puntas de flecha), de modo que, una zona superficial aumenta su electropositividad (más azul) y otras aumentan su electronegatividad (más rojo). Con respecto al mutante N387D (**Figura 42B**) puede observarse que la modificación estructural provocada por el cambio de una asparagina por un aspartato (D³⁸⁷) es bastante parecida a la del mutante N387A. Pero cuando nos fijamos en la distribución del potencial electrostático en esa zona, el aumento de la electronegatividad con respecto al dominio P de RHDV-Nav10/11 es muy significativa (puntas de flecha). Las modificaciones observadas en el modelo de estos dos mutantes puntuales podrían explicar la disminución de la capacidad de unión del anticuerpo 2D9 con N387A y N387D, pero, también indica que podría ser el cambio del potencial electrostático el que provoca la pérdida total de interacción entre 2D9 y N387D. Por otro lado, el modelo del mutante de dominio P AT414-15 (**Figura 42C**) muestra en la estructura tridimensional de la región del lazo 5 que los residuos mutados de asparagina (N⁴¹⁴) y prolina (P⁴¹⁵) forman una protuberancia que no está presente en el dominio P de

RHDV-Nav10/11. Además, esta modificación provoca un aumento de la electronegatividad en la zona de la base de esa protuberancia (punta de flecha).

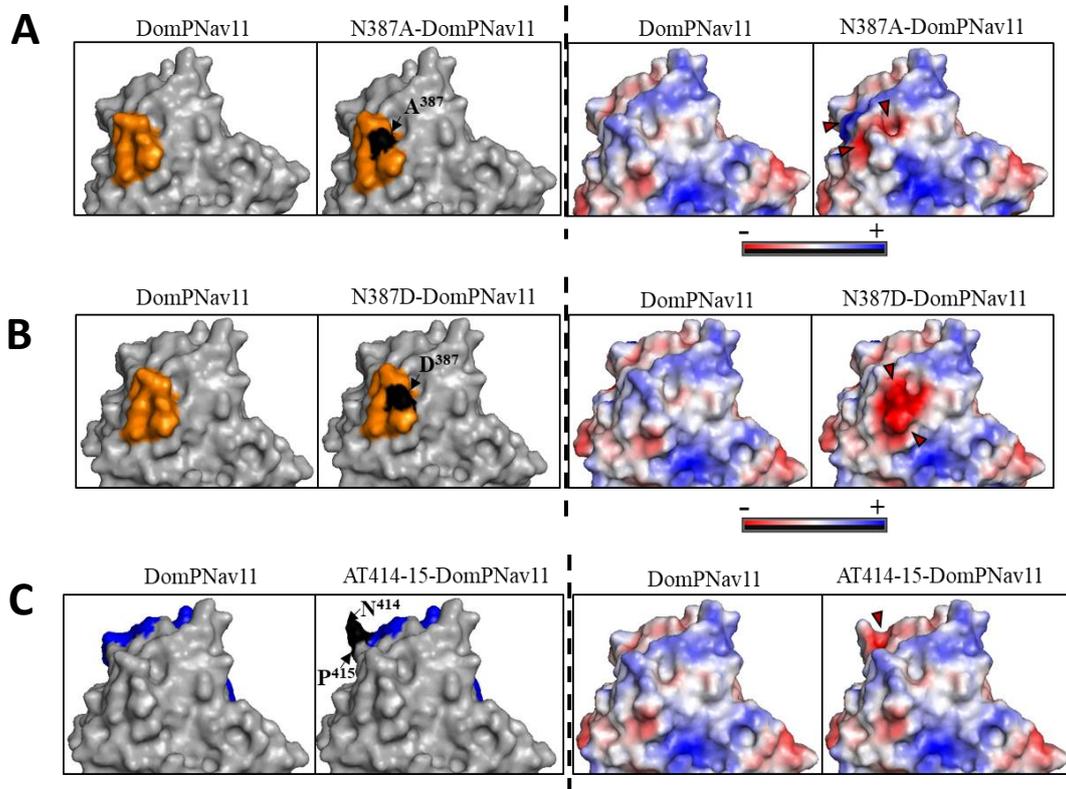


Figura 42. Modelos tridimensionales en vista de superficie (imágenes a la izquierda) y distribución del potencial electrostático (imágenes a la derecha) del dominio P de RHDV-Nav10/11 y los mutantes puntuales (A) N387A; (B) N387D; (C) AT414-15. En naranja se representa el lazo 4 y en azul el lazo 5. En negro se indican los residuos sustituidos.

Los mutantes generados sobre el dominio P de RHDV-Nav10/11 sustituyendo las secuencias de cada uno de los lazos por los presentes en RHDV-Ast89 demostraron que cada uno de los 5 lazos estudiados son importantes en la interacción con 2D9, puesto que en todos los casos su sustitución reduce significativamente la capacidad de unión del anticuerpo (**Figura 24** y **Tabla 16**). Sin embargo, la reducción más acusada de la señal obtenida por ELISA se produce en el caso del mutante del lazo 5, hasta alcanzar una falta total de interacción con el anticuerpo.

Cuando estos mutantes de lazo de dominio P se analizaron en condiciones nativas mediante electroforesis y Western blot, se comprobó que todos parecen mantener la capacidad de formar dímeros, lo que sugiere que la disminución o pérdida de interacción

del anticuerpo monoclonal 2D9 no es debida a la falta de dimerización de estos dominios P (**Figura 23**).

Para aportar datos que puedan explicar los resultados obtenidos en la interacción del anticuerpo 2D9 con los mutantes de lazos del dominio P se han realizado sus modelos tridimensionales representando la estructura y el potencial electrostático en superficie (**Figura 43**). En la **Figura 43A** puede observarse cambios importantes en la superficie del dominio P con los residuos del lazo 1 sustituidos (indicados en negro), sobre todo parecen afectar los residuos Asn307, Asn308, Ala309 y Thr310. La **Figura 43B** indica que los cambios provocan una variación en el potencial electrostático superficial de esa región que se vuelve más electropositiva (más azul, puntas de flecha), con respecto al dominio P de RHDV-Nav10/11.

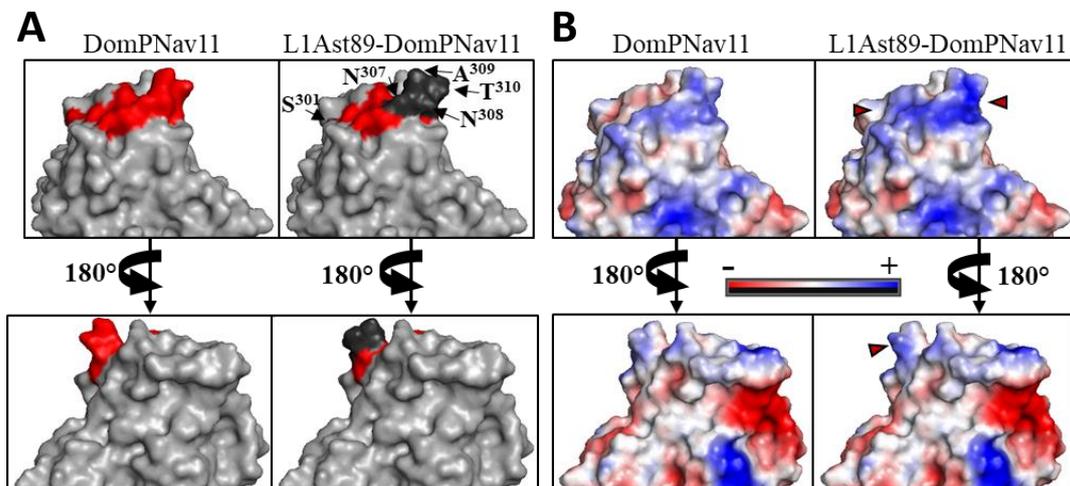


Figura 43. Modelos tridimensionales en vista de superficie (**A**) y de distribución del potencial electrostático (**B**) del dominio P de RHDV-Nav10/11 (DomPNav11) y del mutante de lazo 1 (L1Ast89-DomPNav11).

En lo que se refiere al mutante del lazo 2, las sustituciones de los aminoácidos (marcados en negro) produce también cambios en la superficie del dominio (**Figura 44A**), generando pequeñas protuberancias que podrían estar interfiriendo en la interacción con el anticuerpo 2D9. Sumado a eso aparecen alteraciones de las cargas en superficie que, en el modelo (**Figura 44B**), parece aumentar la electropositividad en algunas de las regiones donde se realizaron las sustituciones (puntas de flecha).

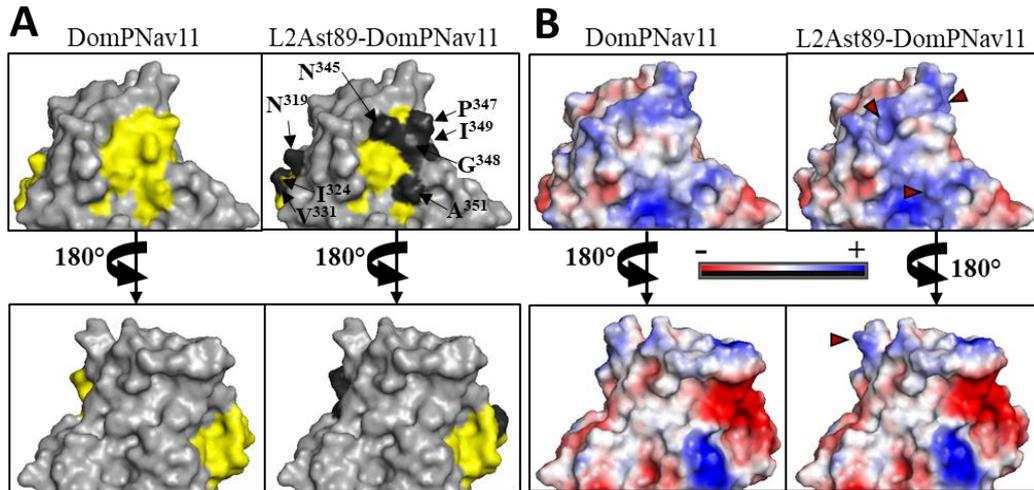


Figura 44. Modelos tridimensionales vistos en superficie (A) y en distribución del potencial electrostático (B) del dominio P de Nav10/11 (DomPNav11) y del mutante de lazo 2 (L2Ast89-DomPNav11).

En el caso del mutante del lazo 3 dónde se sustituyen 3 residuos aminoacídicos (**Figura 45A**), aunque el modelo en superficie no muestra cambios drásticos, las cargas superficiales sí que se ven afectadas en la región correspondiente al residuo Asn369 (N^{369}), provocando un aumento muy importante en la electronegatividad (**Figura 45B**), lo que podría influir en la falta de unión del anticuerpo a este mutante.

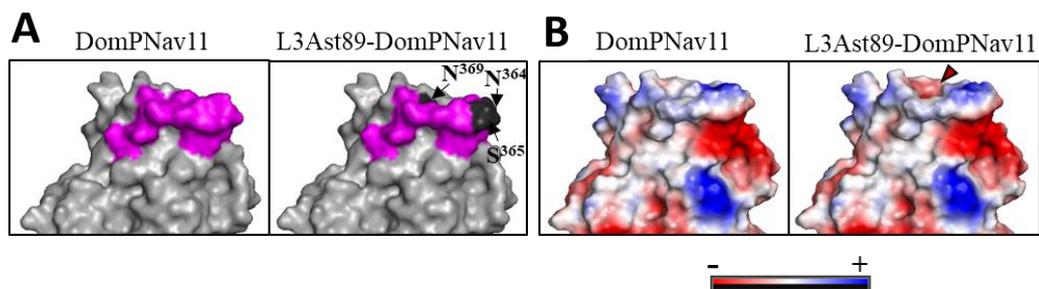


Figura 45. Modelos tridimensionales del dominio P de Nav10/11 (DomPNav11) y del mutante de lazo 3 (L3Ast89-DomPNav11) en vistas de superficie (A) y de distribución del potencial electrostático superficial (B).

Con respecto al mutante L4 en el que dos aminoácidos son sustituidos respecto al dominio P de RHDV-Nav10/11, el único cambio que aparece en la superficie de la proteína en el modelo mostrado en la **Figura 46** corresponde al residuo de glicina Gly386 (G^{386}). Aparentemente, en la superficie de este mutante se pierde una protuberancia que

existe en el dominio de Nav10/11, aunque no afecta demasiado a la distribución de cargas superficial.

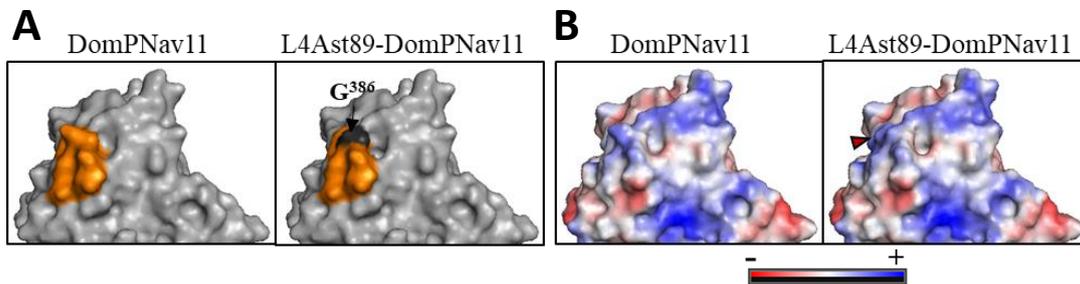


Figura 46. Modelos tridimensionales del dominio P de Nav10/11 (DomPNav11) y del mutante en el lazo 4 (L4Ast89-DomPNav11) mostrando la superficie (A) y la distribución del potencial electrostático (B).

En el modelo generado para el mutante L5, es dónde se observa más claramente la influencia de las sustituciones de residuos en la superficie del dominio P (Figura 47A). Como puede verse, en L5 se forma una importante protuberancia formada posiblemente por las cadenas laterales de los residuos Asn414 (N⁴¹⁴) y Pro415 (P⁴¹⁵) que han sido introducidos (igual que en AT414-15, Figura 42C). En la misma zona, en el modelo de distribución de potencial electrostático (Figura 47B) puede verse un aumento muy importante de la electronegatividad en la base de esa nueva protuberancia. Estos cambios drásticos, juntos con las variaciones en superficie generadas por los residuos Val408 (V⁴⁰⁸) y Ala406 (A⁴⁰⁶), podrían estar explicando porque el anticuerpo 2D9 no es capaz de interaccionar con este mutante.

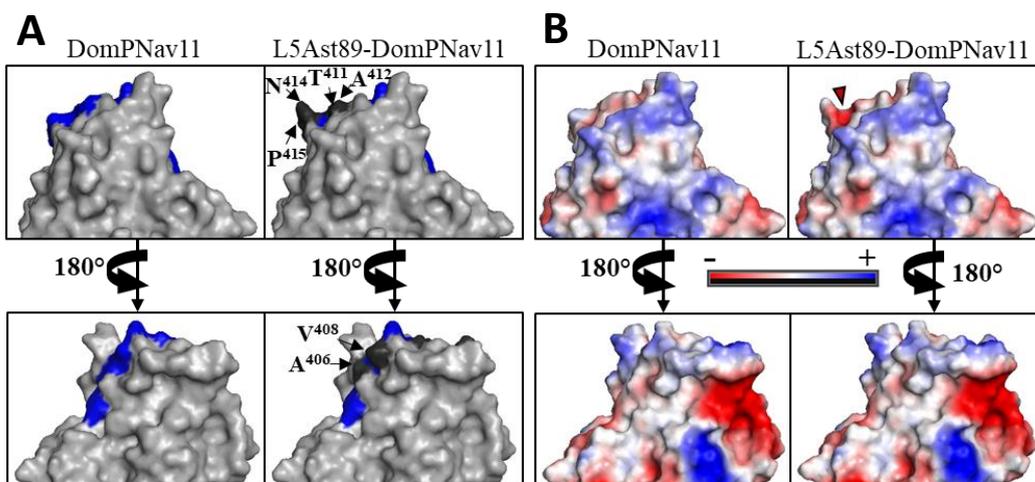


Figura 47. Modelos tridimensionales en vista de superficie (A) y distribución del potencial electrostático (B) del dominio P de RHDV-Nav10/11 (DomPNav11) y el mutante del lazo 5 (L5Ast89-DomPNav11).

Aunque los datos obtenidos sugieren que el lazo 5 del subdominio P2 es el que más influye en la unión con el anticuerpo 2D9, hay que indicar que solamente sustituyendo la secuencia completa por la presente en el lazo del virus RHDV-Ast89 se ha perdido totalmente la interacción con 2D9 como apoya el hecho de que en el mutante AT414-15, en el que únicamente se modificaron dos residuos de este lazo, no se impedía totalmente la unión de 2D9. Una explicación similar podría aplicarse en el análisis del mutante natural (RHDV-Ler11/16-1) que no mostraba reacción con 2D9, y que posee varias mutaciones dentro del lazo 5, y otras localizadas en distintas regiones del dominio P. El análisis de las causas de la falta de reactividad del anticuerpo 2D9 requeriría generar nuevos mutantes puntuales y combinaciones de mutantes con objeto de acotar más la estructura reconocida por 2D9. En nuestro laboratorio se están realizando trabajos complementarios para producir VLPs de este aislado, con las que será posible realizar estudios más en profundidad sobre la falta de reacción de este mutante con el anticuerpo 2D9.

En estudios realizados en otros tipos de RHDV (Wang *et al.*, 2013) se compararon con un norovirus murino los lazos externos del subdominio P2 de RHDVa, y mostraron la equivalencia existente entre los lazos 1 y 5, que casualmente parecen contener el epítipo neutralizante de MNV reconocido por el anticuerpo A6.2 descrito por Taube *et al.*, 2010.

Otra observación derivada de los análisis recogidos en esta tesis es que la acumulación de mutaciones parece aumentar la dificultad de unión del anticuerpo 2D9 con respecto a las mutaciones individuales, tal como se observa en el mutante doble L1L4 (con los lazos 1 y 4 de RHDV-Ast89) en el que se reduce la interacción con el anticuerpo por debajo de como lo hace las mutaciones individuales de los mismos lazos por separado. Esto podría justificarse atendiendo a las modificaciones estructurales y del potencial electrostático en superficie del dominio P, mostradas en las **Figura 43** y **Figura 46** para los mutantes individuales de lazo, que se encontrarían presentes simultáneamente en aquellos mutantes que tienen varios lazos modificados. Estos resultados vuelven a sugerir que el reconocimiento del epítipo de 2D9 requiere una conformación más que una secuencia concreta, de modo que cuando más cambios se producen en la estructura más se dificulta la unión del anticuerpo.

En varios estudios previos se habían descrito las diferencias antigénicas entre el RHDV clásico y la nueva variante (Bárcena *et al.*, 2015; Le Gall-Reculé *et al.*, 2013). En el

presente trabajo de tesis, además de confirmar estas observaciones utilizando distintas metodologías, se han obtenido proteínas recombinantes quiméricas, basadas en secuencias del dominio P de la nueva variante y secuencias correspondientes al virus clásico, que podrían utilizarse como antígenos para desarrollar vacunas bivalentes efectivas frente RHDV-G1 y RHDVb. Estudios previos han demostrado el potencial de las VLPs de RHDV como vectores vacunales (Crisci, E *et al.*, 2012). Concretamente, VLPs quiméricas de RHDV-G1 conteniendo un antígeno heterólogo (M2e) del virus de la gripe dentro del lazo 1 del subdominio P2 producen en ratón una respuesta inmune protectora frente a la infección por el virus (Moreno *et al.*, 2016). Además, otros trabajos muestran que la administración de VLPs de RHDV quiméricas a ratones, cerdos o conejos inducen la producción de anticuerpos específicos tanto frente al antígeno heterólogo que contienen como frente a RHDV (Crisci *et al.*, 2009; Crisci, E *et al.*, 2012; 2015; Crisci, JL *et al.*, 2012; Moreno *et al.*, 2016; Peacey *et al.*, 2007; Peacey *et al.*, 2008). Todo estos trabajos apoyan la posibilidad de diseñar futuras vacunas bivalentes frente a varios tipos de RHDV y, más concretamente, podría ser el dominio P, o alguno de sus lazos, regiones eficaces para la presentación de los antígenos pertenecientes a distintos RHDV.

Dada la especificidad del anticuerpo 2D9 frente a la nueva variante del virus este monoclonal ha tomado un importante papel en el desarrollo del presente trabajo, y junto con el anticuerpo monoclonal 3A10, que reconoce distintos tipos de RHDV, han permitido el desarrollo de útiles herramientas diagnósticas frente a RHDVb en distintos formatos.

Considerando sus características, ambos anticuerpos se emplearon para el diseño de un sistema de inmunodetección, mediante inmunocromatografía lateral, para la identificación rápida y específica de RHDVb en muestras de tejidos de conejos. Este sistema permite detectar la presencia de partículas virales de forma rápida (tan solo 10 minutos), directamente en el campo o granja, usando exudados o muestras de homogeneizados de hígado de conejos (Dalton *et al.*, 2017).

Este sistema de detección de la VP1 de la nueva variante permite también analizar si una determinada muestra, por ejemplo, las vacunas comercializadas en España frente al RHDVb, o los antígenos recombinantes desarrollados en esta tesis, contienen al menos las regiones reconocidas por los anticuerpos en su conformación nativa antes de realizar

la vacunación. El uso de este sistema puede ser útil para evaluar el estado de conservación de las vacunas, o si estas contienen suficiente cantidad de antígeno.

Los valores de sensibilidad (100 %) y especificidad (100 %), así como los valores predictivos positivo y negativo, ambos de 100 %, obtenidos en la evaluación de esta herramienta ponen de manifiesto su potencial para la identificación rápida y específica de RHDVb. Hay que puntualizar que la puesta a punto y validación de esta aplicación diagnóstica ha sido realizada en nuestro laboratorio en colaboración con la empresa CerTest Biotec S.L. que en la actualidad vende en España una versión comercial de este sistema (**Figura 25**).

Por otro lado, con objeto de desarrollar un procedimiento cuantitativo para la detección de viriones RHDVb se han estudiado distintas posibilidades para emplear los anticuerpos 2D9 y 3A10 en ELISA. Las distintas combinaciones probadas de estos anticuerpos junto con el policlonal generado en cabra frente a VLPs de RHDVb han demostrado que un ELISA tipo sandwich basado en la captura de las partículas virales con 2D9 es capaz de detectar todos los aislados de RHDVb (incluidos los de tipo recombinante), sin mostrar reacción con aislados de RHDV clásico. Un solo aislado (RHDVa Oelsnitz) del grupo de muestras de RHDVa mostró reacción positiva en este ensayo, pero el porcentaje observado de densidad óptica fue de 13 %, cercano al punto de corte de 9 % determinado para este ELISA (**Tabla 19**) (Dalton *et al.*, 2018c). La sensibilidad (100 %) y especificidad (97,22 %) de esta técnica son más que aceptables para su aplicación diagnóstica en el laboratorio. Como ya se ha comentado, en la actualidad hay disponibles varias herramientas diagnósticas para la detección de RHDVb (Bárcena *et al.*, 2015; Dalton *et al.*, 2018a; Dalton *et al.*, 2017). Estas técnicas de ELISA pueden proporcionar unos resultados robustos, relativamente baratos y cuantitativos de muestras individuales permitiendo tipificar los aislados de RHDVb o RHDV clásico, sin la necesidad de realizar RT-PCR o secuenciación.

En este trabajo se ha comprobado la utilidad de los anticuerpos monoclonales para desarrollar herramientas diagnósticas (Nelson *et al.*, 2000), así como para aportar información básica sobre la antigenicidad de las proteínas de la cápsida de virus y para identificar aquellas regiones que podrían ser importantes para el desarrollo de vacunas frente a virus emergentes como RHDVb (Kong *et al.*, 2016).

5.3. EVALUACIÓN DE DISTINTAS ESTRATEGIAS VACUNALES E IMPORTANCIA DEL ANTÍGENO VACUNAL EMPLEADO

Los estudios previos han demostrado la falta de protección, en el mejor de los casos parcial, de las vacunas basadas en el virus RHDV clásico frente a la nueva variante del virus (Bárcena *et al.*, 2015; Dalton *et al.*, 2014). Por tanto, uno de los objetivos de este trabajo suponía el diseño, producción y evaluación de una vacuna efectiva frente a RHDVb. Dadas las diferencias antigénicas comprobadas entre el virus clásico y la nueva variante nuestro estudio se ha basado principalmente en candidatos vacunales que contengan antígenos o regiones previsiblemente antigénicas de este nuevo virus.

Como se había visto en un estudio previo, un péptido sintético basado en uno de los lazos expuestos del subdominio P2 (lazo 1) de RHDVa era capaz de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes frente a dicho virus (Wang *et al.*, 2013). Por tanto, en este trabajo, antes de realizar otros estudios detallados sobre la estructura antigénica de la VP1 de RHDVb, nos planteamos la posibilidad de que ocurriese lo mismo en el caso de RHDVb. Dado que ya disponíamos de un péptido sintético basado en la secuencia del lazo 1, nombrado NL15, solo fue necesario la conjugación con una proteína inductora del sistema inmune como KLH para incrementar el potencial antigénico del péptido. La vacunación de 8 gazapos con este candidato vacunal donde se aplicaron hasta 4 dosis de recuerdo durante un periodo de 72 días no tuvo un resultado positivo en lo que se refiere a la producción de anticuerpos frente a RHDV (**Tabla 21**). Curiosamente, los sueros analizados por Western blot (**Figura 33**) revelaron la presencia de anticuerpos inespecíficos puesto que un suero de conejo inmunizado con KLH reaccionaba frente al dominio P de RHDVb, lo cual podría explicarse a una inducción del sistema inmune inespecífico provocado por la propia KLH. Mediante ELISA se comprobó que al finalizar el periodo de vacunación los animales contenían anticuerpos frente a la proteína KLH y al péptido conjugado, sin existir diferencias significativas entre los animales control y los vacunados con el péptido conjugado (**Figura 34**). También se observó un bajo nivel de anticuerpos frente al péptido NL15 sin conjugar en los sueros de los animales vacunados con el péptido conjugado, pero no en los sueros de animales control. No obstante, en ELISA frente a VLPs de RHDVb se comprobó la falta de anticuerpos, con los niveles por debajo del punto de corte del ensayo, en todos los animales tratados, en la misma línea que los resultados observados por Western blot.

El desafío de los animales tratados con estos péptidos permitió demostrar que la vacunación con este péptido sintético conjugado con KLH (KLH-NL15) no era una buena opción para hacer frente a la enfermedad causada por la nueva variante del virus. La baja inmunogenicidad de los péptidos se ha comprobado que es una importante limitación para el uso de estas moléculas como vacunas. Debido al pequeño tamaño de estas moléculas no inducen de forma tan efectiva a como lo hacen estructuras antigénicas de mayor tamaño como podría ser una partícula viral completa. Por tanto, nuestros resultados difieren de los obtenidos en el estudio de Wang *et al.*, 2013, donde la vacunación con el péptido sintético conjugado basado en RHDVa sí protegió frente al virus. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en estudios estructurales de los dominios P de RHDVa y RHDVb se han observado diferencias en cuanto a la unión del dominio P a HBGAs y en la orientación de los lazos del subdominio P2, mostrando que las estructuras de los dominios P de ambos tipos de RHDV son moderadamente diferentes (Leuthold *et al.*, 2015). Por tanto, no puede afirmarse que, si el lazo 1 del subdominio P2 de RHDVa contiene epítomos neutralizantes del virus, ocurra igual en el caso del mismo lazo de RHDVb. Los análisis de predicción de estructuras e interacción de anticuerpos monoclonales realizados en otros apartados de esta tesis permiten sugerir que la utilización de otros lazos (L4 y L5) del dominio P de la VP1 de RHDVb en experimentos de inmunización, podría dar mejores resultados de protección y constituyen un objetivo para las investigaciones futuras del laboratorio.

En vista de la problemática que supone la enfermedad hemorrágica del conejo causada por la nueva variante del virus RHDVb en poblaciones silvestres de conejo de monte, y teniendo en cuenta la dificultad que supone vacunar a dichos animales en el campo, en este trabajo se ha iniciado un estudio prospectivo sobre el potencial de las bacterias lácticas recombinantes, que expresan el dominio P de RHDV, como un nuevo candidato vacunal aplicable por vía oral. De este modo se pretende obtener candidatos vacunales que puedan administrarse de un modo que evite la captura, y manejo de los conejos, así como el estrés que ello les conlleva. Estos procedimientos podrían aplicarse tanto en poblaciones silvestres como en animales de granja o domésticos.

En este trabajo se han construido lactobacilos recombinantes que contienen integradas en su genoma distintas secuencias de dominios P (RHDV-G1 o RHDVb), así como regiones que permiten la expresión de dichos dominios en distintas formas, bien anclados

a la pared bacteriana o secretados al medio de cultivo. Este trabajo contribuye a investigar las distintas posibilidades que permiten estas bacterias para la expresión de antígenos heterólogos y su potencial uso como agentes probióticos, como ha sido demostrado en otros estudios frente a infecciones por Rotavirus y Norovirus (Hoang *et al.*, 2015; Martín *et al.*, 2011). A su vez, al ser organismos que pueden establecerse como microbiota intestinal en los conejos, son vectores vacunales potencialmente muy prometedores.

Los análisis de expresión de las construcciones de dominios P anclados a la pared bacteriana mostraron niveles bajos no detectables por Western blot, sin embargo, se demostró la presencia del dominio P mediante citometría de flujo (**Figura 28**). En el caso de los dominios P secretados al medio no fue posible la detección por Western blot a pesar de concentrar previamente las proteínas del sobrenadante mediante precipitación con ácido tricloroacético. Las cantidades tan bajas e indetectables obtenidas en este sistema de expresión de los dominios P podrían deberse a que la expresión en los lactobacilos recombinantes ha sido diseñada para que se produzca de forma constitutiva y posiblemente a un efecto de baja dosis génica, al tratarse de vectores integrativos. En anteriores estudios dónde se diseñaron y generaron lactobacilos recombinantes que expresaban la proteína VP1 de un norovirus humano bajo un promotor inducible, se consiguió observar la presencia de la proteína VP1 mediante Western blot pese a que los niveles de expresión también eran bajos (Martín *et al.*, 2004). Por tanto, un cambio en el sistema de expresión de los dominios P de RHDV a una construcción inducible tampoco promete dar lugar a resultados muy diferentes a los obtenidos en cuanto a niveles de producción del antígeno. Por otro lado, la necesidad de inducción, es decir el uso de inductores exógenos, haría poco práctico el uso de estas construcciones para vacunar animales silvestres.

Dado que los únicos lactobacilos recombinantes en los que se pudo detectar la presencia de dominios P de RHDV fueron los que expresan este antígeno anclado a la pared bacteriana, este tipo de bacterias se seleccionaron para la evaluación de su eficacia protectora frente al RHDV. El ensayo en conejos para determinar la inducción del sistema inmune y la protección frente al virus se desarrolló mediante la administración oral de las distintas construcciones de bacterias recombinantes por separado.

En los análisis de la producción de anticuerpos frente a RHDV en los conejos vacunados oralmente con lactobacilos, se observaron niveles bajos de anticuerpos tanto

frente a VLPs de RHDV-Ast89 como frente a VLPs de RHDV-Nav10/11 (**Figura 37**). Sin embargo, pese a los reducidos títulos de anticuerpos existen diferencias entre los distintos grupos de conejos vacunados con lactobacilos recombinantes. En el caso de los anticuerpos frente a VLPs de RHDV-Nav10/11 (**Figura 37A**), los sueros de conejos vacunados con lactobacilos que expresan dominio P de RHDV-Nav10/11 parecieron mostrar niveles ligeramente superiores a los 25 dpi, aunque posteriormente disminuyeron a los 64 dpi y, en todos los casos, son muy similares y en su mayoría inferiores a los del punto de corte de la técnica de ELISA. Por otro lado, la detección de anticuerpos frente a las VLPs de RHDV-Ast89 (**Figura 37B**), reveló diferencias significativas con respecto a los valores obtenidos frente a VLPs de RHDV-Nav10/11 (**Tabla 22**). Curiosamente, en el grupo de animales inmunizados con los lactobacilos que expresan dominio P de RHDV-Nav10/11, aparecen anticuerpos detectables frente a VLPs de RHDV-Ast89 a los 25 dpi y se mantiene hasta el día 64 dpi, hecho que no ocurre frente a VLPs de RHDV-Nav10/11. En el caso del grupo de animales inmunizados oralmente con lactobacilos que expresan el dominio P de RHDV-Ast89 sin cola de histidinas, los anticuerpos frente a VLPs de RHDV-Ast89 aparecen en el suero a los 64 dpi, algo que no ocurre en el grupo de animales vacunados con los lactobacilos que expresan los mismos dominios P con cola de histidinas que, curiosamente, no muestran presencia de anticuerpos frente a dichas VLPs en ninguno de los sueros muestreados.

La presencia de anticuerpos detectables frente a VLPs de RHDV-Ast89 en los sueros del grupo control tratado con el lactobacilo silvestre (BL23), podría explicarse atendiendo a las propiedades probióticas de esta bacteria ya mencionadas en otros trabajos (Lee *et al.*, 2015). Sin embargo, solo se ha demostrado que actúan modulando la respuesta inmune del hospedador, a través de células T reguladoras acompañando a una expresión de citoquinas reguladoras (Cortes-Perez *et al.*, 2017; Foligne *et al.*, 2007; Lenoir *et al.*, 2016).

La falta de inducción suficiente del sistema inmune para la producción de anticuerpos evidenciada por los resultados de las pruebas ELISA permite anticipar una falta de protección frente al virus como se comprobó posteriormente en el ensayo de infección con RHDVb (**Figura 38**). Estos resultados sugieren que la vacuna oral diseñada y evaluada en este trabajo no posee capacidad para inmunizar de forma efectiva a los conejos. Por otro lado, no se ha podido demostrar de forma clara que los lactobacilos

recombinantes sean capaces de colonizar el tracto digestivo de los conejos, lo que supondría que el antígeno permanecería en el organismo del animal durante un tiempo limitado, menor del que se esperaba con esta estrategia vacunal. Además, hay que recordar que el dominio P de RHDV se expresa fusionado con secuencias de otras proteínas que le ayudan al anclaje a la pared bacteriana, no podemos demostrar que la estructura adquirida por este dominio en el exterior de la bacteria sea la misma en la que se dispone en la cápsida del virus o la VLP, ni que puedan llegar a adoptar estructuras diméricas que son importantes para la interacción de algunos anticuerpos neutralizantes como el 2D9 caracterizado en esta tesis. Para investigaciones futuras sobre estos lactobacilos recombinantes como vacuna oral viva, se podría realizar la inserción en el genoma de varias copias seguidas de la secuencia del dominio P (en tándem), que se traducirían en una única proteína. De este modo, se esperaría la expresión de mayor cantidad de antígeno y cabría una mayor probabilidad de que los dominios P anclados a la pared quedasen lo suficientemente cercanos para formar dímeros.

Es necesario comentar también que la vía de administración de los antígenos vacunales es muy importante a la hora de la inducción de una respuesta inmune efectiva y que las inmunizaciones orales requieren normalmente una mayor cantidad de inmunógeno (de Aizpurua y Russell-Jones, 1988) comparado con la ruta parenteral. Estos hechos, unidos al bajo nivel de expresión del antígeno que presentaron los distintos lactobacilos recombinantes diseñados en este trabajo, a los que puede sumarse la posibilidad de una degradación del dominio P a lo largo del tracto digestivo, podrían explicar la falta de efectividad de este candidato vacunal.

En otras partes de esta tesis se ha comprobado que el dominio P de RHDV-Nav10/11 contenía epítomos neutralizantes frente a RHDVb, por lo que este antígeno constituyó un candidato vacunal cuya eficacia requiere ser analizada mediante ensayos *in vivo* con animales. Por otro lado, dado que actualmente existe una limitación en las herramientas diagnósticas que no permiten distinguir si los anticuerpos presentes en sueros de conejos provienen de una vacunación previa o bien de una exposición natural al virus, nos planteamos también la posibilidad de generar el antígeno vacunal marcado en forma de proteína de fusión con GST. De este modo la presencia de anticuerpos frente a la GST podría constituir una indicación de que un animal ha sido vacunado. La fusión GST-dominio P obtenida y expresada en bacterias se purificó con el fin de ser administrada a

conejos, una vez que se demostró que adquiriría la conformación natural presente en la cápsida viral puesto que reaccionaba positivamente con el anticuerpo neutralizante 2D9.

Además de los antígenos anteriores, y teniendo en cuenta los resultados mostrados en otros estudios sobre la vacunación con VLPs, se han producido y evaluado una preparación de VLPs de la nueva variante RHDVb, más concretamente, del aislado RHDV-Nav10/11. En multitud de trabajos publicados se ha expresado el gen de la proteína VP1 de RHDV de forma heteróloga, mostrando su capacidad de autoensamblarse para formar VLPs, así como sus propiedades inmunogénicas y de inducción de la protección frente al virus RHDV. Los sistemas de expresión empleados en esos trabajos han sido muy variados, desde bacterias (Boga *et al.*, 1994; Guo *et al.*, 2016), baculovirus (Laurent *et al.*, 1994; Marín *et al.*, 1995; Nagesha *et al.*, 1995; Pérez-Filgueira *et al.*, 2007; Plana-Duran *et al.*, 1996), plantas (Castañón *et al.*, 1999; Fernández-Fernández *et al.*, 2001; Gil *et al.*, 2006; Mikschofsky *et al.*, 2009), adenovirus (Fernandez *et al.*, 2011), levaduras (Boga *et al.*, 1997; Fernandez *et al.*, 2013), hasta en forma de vacunas bivalentes mediante virus mixoma recombinantes (Angulo y Bárcena, 2007; Bárcena *et al.*, 2000; Bertagnoli *et al.*, 1996; Spibey *et al.*, 2012; Torres *et al.*, 2000). Por tanto, a la luz de los resultados obtenidos con VLPs de RHDV clásico cabría esperar resultados similares para el caso de una vacuna basada en las VLPs de la nueva variante del virus que nos planteamos en el presente trabajo.

La expresión de la proteína VP1 empleando baculovirus recombinantes ha demostrado ser una potente herramienta para la producción de cantidades suficientes de VLPs en cultivos celulares para su purificación y administración a conejos. Para obtener mejores rendimientos, en varios trabajos previos se ha optimizado este sistema de expresión por baculovirus (Gomez-Sebastian *et al.*, 2014; López-Vidal *et al.*, 2015) y se ha escalado la producción de VLPs utilizando factorías vivas como crisálidas y larvas de insectos (*Trichoplusia ni*) (Guijarro-Pardo *et al.*, 2017; Pérez-Filgueira *et al.*, 2007). Con estos antecedentes, en este trabajo se ha evaluado la inducción de la respuesta inmune y la protección frente a RHDVb administrando VLPs producidas en estos dos sistemas basados en la infección por baculovirus recombinantes bien de cultivos celulares, o bien, de crisálidas de insecto.

El análisis comparativo de la expresión de VP1 y obtención de VLPs en cultivos celulares se llevó a cabo empleando secuencias nucleotídicas de VP1 de RHDV-

Nav10/11 tanto nativas como optimizadas para su expresión en células de insecto. Además, se analizó la expresión de la VP1 en distintos tipos celulares (Sf9 y HF) que permitían la obtención de las VLPs de forma extracelular o intracelular, respectivamente. En estos estudios se pudo comprobar la importancia de la optimización de la secuencia para su expresión en células de insecto, mostrando un incremento de 3,6 y 50 veces (HF y Sf9, respectivamente) la producción de VLPs cuando se empleaban baculovirus que contenían la secuencia optimizada de la VP1 (**Tabla 20**), al igual que lo recogido en estudios previos de optimización de la secuencia para la expresión en baculovirus (López-Vidal *et al.*, 2015). Además, se ha comprobado que el tipo celular empleado, que condiciona la expresión intracelular o extracelular debe ser otro aspecto a tener en cuenta a la hora de producir VLPs en cultivos celulares. En esta tesis, se ha estudiado también el uso vacunal de la presencia de extractos de crisálidas infectadas con baculovirus recombinantes optimizados para la expresión de VP1 en células de insecto (**Figura 31**). La eficacia del uso de los insectos como factorías vivas (biorreactores) para la producción de proteínas o estructuras complejas como pueden ser las VLPs, puede deberse a que el elevado número de células y multitud de tipos celulares presentes en un organismo completo como un insecto permite un elevado rendimiento de la producción a un bajo coste (Guijarro-Pardo *et al.*, 2017; Kato *et al.*, 2010; Pérez-Filgueira *et al.*, 2007; Pérez-Martín *et al.*, 2010) en comparación con los biorreactores convencionales. Los estudios previos se han centrado en el uso de fases larvarias de *Trichoplusia ni*, pero la utilización de las crisálidas presenta numerosas ventajas. En cuanto a producción se habla de términos similares (comunicación personal de ALGENEX), pero en esta fase evolutiva se elimina la presencia del aparato digestivo del insecto, con lo que se disminuye la carga bacteriana, hay menor degradación de la proteína recombinante, se reduce la contaminación de lípidos en el extracto final y, como principal ventaja, ofrece la posibilidad de automatizar el proceso de inoculación con el baculovirus mediante robots diseñados para ello. Para comprobar que los extractos de crisálidas producidos por ese sistema contienen las VLPs de RHDVb y son susceptibles de ser utilizados en vacunas, uno de los objetivos planteados en este trabajo fue comprobar la inmunogenicidad y capacidad de protección frente al virus tras la vacunación con extractos de crisálidas que producen VLPs de RHDVb.

El efecto de los adyuvantes como compuestos que tienen efectos sobre la inducción del sistema inmune cuando se utilizan en mezclas vacunales se ha demostrado en

múltiples estudios siendo, en la actualidad, uno de los componentes de las vacunas disponibles frente a RHDV. Por tanto, en este trabajo hemos estudiado además de la vacunación con VLPs purificadas, extractos de crisálidas que producen VLPs o dominios P la posible influencia del adyuvante en la inducción del sistema inmune y la protección frente a la infección por el virus RHDVb.

Las inmunización de grupos de gazapos control, tratados con PBS o PBS con adyuvante (AlOH₃) reveló que este adyuvante de forma individual no es capaz de proteger o retrasar la muerte de los animales tras la infección con el virus RHDVb (**Figura 40A**). Sin embargo, cuando se vacunaron los conejos con mezclas de adyuvante y VLPs purificadas o extractos de crisálidas se observó un incremento en la tasas de supervivencia con respecto a los conejos vacunados con la misma cantidad de antígeno en ausencia de adyuvante (**Figura 40B**). De este modo, en presencia de adyuvante la vacunación con VLPs purificadas de RHDVb protegió al 100 % de animales mientras que, al utilizar extractos de crisálidas, que contienen VLPs de RHDVb, en presencia de adyuvante se consigue la protección del 50 % de los animales. Hay que destacar que cuando los conejos se trataban con las mismas cantidades de antígenos, en ausencia de AlOH₃, la mortalidad observada fue del 100 % entre los días 1 y 3 después del reto viral, al igual que en los grupos control tratados con PBS o PBS con adyuvante (**Figura 40A** y **Figura 40B**). Con estos resultados se ha comprobado una vez más el potencial vacunal de las VLPs y su capacidad para proteger frente a la nueva variante del virus como se ha publicado recientemente frente a un aislado francés de RHDVb (Müller *et al.*, 2019). En los estudios recogidos en esta tesis se ha demostrado también el efecto beneficioso del adyuvante para ayudar a incrementar el poder inmunizador de los antígenos. En otros estudios posteriores realizados en el laboratorio, no recogidos en esta tesis, ha podido demostrarse que el uso de cantidades mayores de antígenos hace innecesario el uso de adyuvantes de inmunidad.

Otro de los objetivos de esta tesis consistió en la evaluación de la capacidad protectora de las fusiones GST-dominio P del RHDVb, en presencia o ausencia de adyuvante (AlOH₃). Tras la administración de 10 µg/animal de GST-dominio P en presencia de adyuvante los animales murieron entre los días 1 y 3 tras la infección con RHDVb al igual que los animales de los grupos control (**Figura 40A** y **Figura 40C**). Cuando se aumentó la dosis de antígeno a 100 µg/animal en presencia de adyuvante todos los animales sucumbieron, aunque la muerte se retrasó hasta los 5 días tras el reto viral. De forma

sorprendente cuando los animales se trataron con la misma cantidad de antígeno, en ausencia de adyuvante se observó una supervivencia del 50 % de los conejos a partir de los 4 días tras la inoculación del virus. Estos resultados contrastan con los obtenidos para la vacunación con VLPs o extractos de crisálidas. No obstante, hay que tener en cuenta el reducido número de animales empleados (4 animales por grupo) y las condiciones estrictas de desafío empleadas dado que la exposición al virus se realizó a los 7 días desde la vacunación.

Cabe mencionar que existe una mayor protección tras vacunar con una dosis de VLPs purificadas de 5 µg/animal que tras vacunar con 100 µg/animal de la fusión GST-P. Estos resultados reflejan que pese al aumento de las dosis los dominios P, por sí solos, pudieran no ser suficientemente inmunogénicos en comparación con las VLPs completas y que, al igual que en el caso de la vacunación con el péptido sintético, el tamaño y la estructuración del antígeno vacunal sea importante a la hora de inducir una respuesta inmune efectiva. De hecho, ya existe una diferencia importante entre la vacunación con el péptido sintético conjugado KLH-NL15 que no produjo ningún tipo de protección y el dominio P completo que ha protegido al 50 % de los conejos. En el caso de una misma dosis de VLPs (5 µg/animal) en los extractos de crisálidas la protección también fue menor que con las VLPs purificadas, lo que podría deberse a que las VLPs podrían estar “enmascaradas” o de alguna forma unidas a otras proteínas solubles del extracto que impidan el reconocimiento del antígeno por parte del sistema inmune del conejo.

Para el estudio de la inducción del sistema inmune tras la vacunación con VLPs o dominio P de RHDVb se analizó la presencia de anticuerpos frente a RHDV, en los sueros recogidos de los animales supervivientes. Mediante el uso de un sistema de ELISA comercial (Ingenasa) se observó la presencia de anticuerpos en todos los animales supervivientes del grupo vacunado con VLPs purificadas y adyuvante (**Tabla 24**). En el caso de los 2 animales supervivientes vacunados con extractos de crisálidas con VLPs y adyuvantes, en uno de ellos no se detectaron anticuerpos. En los sueros de los dos conejos supervivientes vacunados con la fusión GST-P se observó la presencia de anticuerpos, pero en niveles cercanos al punto de corte del ELISA.

Para comprobar la especificidad de los anticuerpos presentes en el suero se utilizó un ELISA indirecto empleando como antígenos VLPs de RHDV clásica (las mismas que el sistema de Ingenasa) o VLPs de RHDVb (**Tabla 25**). En los resultados obtenidos se

demuestra la presencia de anticuerpos frente a ambos tipos de VLPs en todos los animales supervivientes. Sin embargo, se muestran diferencias importantes entre las cantidades de anticuerpo frente a uno u otro tipo de VLPs, 5 de los animales supervivientes (62,5 % de los animales supervivientes) contienen mayor cantidad de anticuerpos frente a VLPs de RHDV-Nav10/11 (RHDVb) que frente a VLPs del virus clásico. Estos resultados están de acuerdo con los trabajos previos que describían diferencias antigénicas de ambos virus (Bárcena *et al.*, 2015; Dalton *et al.*, 2012). En dos de los animales supervivientes (25 % de los supervivientes) los valores obtenidos frente a VLPs de ambos tipos son similares, lo que demostraría una reactividad cruzada de los anticuerpos. Solo en uno de los animales supervivientes, vacunado con extractos de crisálidas que producen VLPs, (12,5 % de los supervivientes) se obtuvo mayor cantidad de anticuerpos frente a RHDV clásico que frente a RHDV-Nav10/11. La presencia de anticuerpos frente a VLPs de RHDV-Ast89 en animales vacunados con VLPs completas de RHDVb (purificadas o en extractos) podría indicar que la vacunación con este antígeno podría proteger al menos parcialmente a un porcentaje de conejos frente al virus clásico, a diferencia de lo que ocurre con la vacunación con el dominio P de RHDVb que no induce una producción importante de anticuerpos frente a VLPs de RHDV-Ast89.

La evaluación para una posible aplicación de la fusión GST-P como vacuna marcada se ha realizado mediante la detección por ELISA de anticuerpos frente a GST en sueros de los animales supervivientes tratados con GST-P o VLPs. Los resultados obtenidos muestran la falta de anticuerpos detectables frente GST en todos los animales estudiados. La imposibilidad de diferenciar mediante ELISA los sueros de los animales vacunados con GST-P respecto al resto, indica que este antígeno vacunal no sería una buena opción como vacuna marcada. Sin embargo, hay que indicar que el limitado tiempo (sólo 7 días) entre la administración de la fusión GST-P y el reto viral con RHDV en el ensayo *in vivo* realizado podrían explicar la ausencia de anticuerpos frente a la proteína GST. También es importante indicar que la inoculación del virus supone un refuerzo para la inducción de la producción de anticuerpos frente al dominio P, pero no frente a la proteína GST puesto que ésta no se administró al realizar el reto viral.

Teniendo en cuenta que la secuencia de la proteína GST empleada en este ensayo de vacunación pertenece a una especie de *Pseudomonas*, y analizando la secuencia tiene aproximadamente un 45 % de homología con la GST de conejo, se plantea para futuros

estudios el utilizar una proteína GST menos parecida a la de conejo. Sin embargo, otros estudios han puesto de manifiesto que el uso de esta proteína modificada conteniendo epítomos de células T de la toxina difteria es capaz de inducir la producción de anticuerpos en ratones (Pillai *et al.*, 1995), esto sugiere que, aunque la proteína GST por sí no induzca una respuesta inmune en conejos, puede ser modificada añadiéndole epítomos marcadores que sí lo hagan. En trabajos realizados sobre parásitos de humano (Diemert *et al.*, 2017; Grezel *et al.*, 1993), oveja (Gupta *et al.*, 2005; Sexton *et al.*, 1990), o vaca (Morrison *et al.*, 1996) han indicado que la proteína GST del propio parásito empleada como vacuna induce la producción de anticuerpos, aportando resultados que indican la buena inmunogenicidad de la proteína GST.

La persistencia del virus en el organismo de los conejos vacunados se estudió mediante un sistema de detección de ARN viral en hígado de conejos desarrollado previamente en nuestro laboratorio (Dalton *et al.*, 2018a). La ausencia de copias de ARN viral en hígado de los conejos supervivientes vacunados con VLPs purificadas (5 µg) y con adyuvantes demostró que además de la protección frente a la enfermedad, los conejos fueron capaces de eliminar al virus de su organismo (**Figura 41**). En uno de los animales supervivientes vacunado con la fusión P-GST tampoco se detectó la presencia del virus. El número de copias de ARN viral se encontraba reducido en todos los animales vacunados con cualquiera de los antígenos probados con respecto al grupo control de animales inyectados con PBS (**Figura 41**). En el caso de los animales supervivientes vacunados con extractos de crisálidas éstos presentan un número de copias de ARN viral muy inferior al de los animales que murieron del mismo grupo, demostrándose que la carga viral en los animales supervivientes es menor.

En este trabajo se ha demostrado que la vacunación con VLPs purificadas de RHDVb protege de forma efectiva a los conejos frente a la infección por el virus y, además, al eliminar totalmente la presencia del virus del organismo del animal evita que se convierta en un foco de infección para otros conejos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos con la vacunación con extractos de células de insecto que expresan VP1 de RHDVb (Müller *et al.*, 2019).

Tras todos los estudios realizados en esta tesis resulta evidente que la complejidad del antígeno empleado para inmunizar frente al RHDV es un factor condicionante para el nivel de protección que puede alcanzarse. En nuestros estudios puede comprobarse la

mayor eficacia de las VLPs frente a los dominios P o algún lazo expuesto de estos, así como la influencia de las dosis de antígenos y/o presencia de adyuvantes a la hora de conseguir una inmunidad protectora suficiente.

También se han aportado datos en lo que se refiere a la utilización de bacterias recombinantes, administrables por vía oral. Parece evidente la necesidad de aumentar los niveles de expresión en este tipo de hospedadores y procurar que los antígenos expresados puedan alcanzar un nivel de estructuración suficiente. Este último aspecto es un condicionante importante a la hora de conformar las estructuras identificadas por los anticuerpos neutralizantes, del tipo reconocido por el monoclonal 2D9, que parece identificar estructuras presentes únicamente en las formas diméricas de los dominios P de la VP1. El sistema de expresión utilizado para el anclaje de antígenos en la pared de los lactobacilos, aunque permite una mejor presentación de éstos, no parece que sea el sistema de elección para los dominios P, dado que posiblemente impediría su dimerización. Por tanto, cabe proponer para futuros trabajos encaminar los esfuerzos a mejorar la expresión extracelular, posiblemente de la VP1 completa de RHDV. Este tipo de estrategia consistente en el uso de bacterias lácticas vivas, que expresan antígenos relevantes y con capacidad colonizadora del intestino de los conejos, podría ser una alternativa en la que basar la vacunación de los conejos y otros animales silvestres en los que otros tipos de estrategias vacunales son actualmente inviables.

En este trabajo se ha puesto de manifiesto la importancia de emplear como antígeno VLPs de RHDVb cuando se realizan análisis de la producción de anticuerpos frente a esta variante. En los sueros analizados de animales vacunados con antígenos pertenecientes a RHDVb se observa que, aun habiendo anticuerpos que reconocen antígenos basados en RHDV clásico (VLPs de RHDV-Ast89 o antígeno del sistema de Ingenasa), existen otros anticuerpos que no se detectan al ser específicos frente a RHDVb. Por ello, en algunos casos, se subestima la presencia de anticuerpos frente a RHDV empleando el sistema comercial de Ingenasa o un ELISA indirecto basado en VLPs de Ast89, si se compara con los resultados obtenidos empleando VLPs de RHDVb como antígeno en ELISA (**Tabla 24** y **Tabla 25**). Atendiendo a estos datos, las diferencias antigénicas entre RHDV-G1 y RHDVb implican que en el análisis mediante ELISA de la presencia de anticuerpos en sueros frente a RHDV sea importante considerar a qué tipo de RHDV pertenecen los antígenos empleados. En un estudio anterior, ya ha sido puesto de

manifiesto que las diferencias antigénicas entre RHDV-G1 y RHDVb crean la necesidad de utilizar análisis diagnósticos específicos frente a RHDVb para estudiar la dispersión del virus (Bárcena *et al.*, 2015).

Conclusiones

6. CONCLUSIONES

1. La inmunización de ratones con VLPs derivadas del RHDV clásico o del RHDVb han permitido la obtención de hibridomas productores de anticuerpos específicos para cada tipo de RHDV, aportando nuevos datos sobre la existencia de diferencias antigénicas entre ambos virus.
2. De un total de 14 hibridomas, obtenidos tras un proceso de cribado y clonación, solo 4 de ellos fueron seleccionados ya que producen anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades frente a distintos RHDV.
3. El hibridoma 82 produce un anticuerpo monoclonal que reconoce un epítipo conformacional específico de RHDV clásico (RHDV-G1 y RHDVa), ausente en RHDVb.
4. Se han obtenido hibridomas productores de los anticuerpos monoclonales 3A10 y 8E10 que reconocen epítipos lineales de varios tipos de RHDV al reaccionar con el dominio S de la VP1, región más conservada de esta proteína en dichos virus.
5. El anticuerpo monoclonal 2D9 es específico y neutralizante de la nueva variante de RHDV, interaccionando con la superficie externa del dominio P en forma de dímero. El reconocimiento del anticuerpo requiere una conformación tridimensional concreta de la región más expuesta del dominio P (subdominio P2).
6. Una mutación puntual (N387D) presente en un aislado natural de RHDVb (RHDV-Ger06/12-2) dentro del lazo 4 del subdominio P2, impide totalmente la unión del anticuerpo 2D9, aunque otra sustitución (N387A), en la misma posición que la anterior, no provoca el mismo efecto.
7. Mediante técnicas *in silico* y generación de mutantes, se ha demostrado la importancia de los lazos expuestos del subdominio P2 para la interacción del anticuerpo neutralizante 2D9, siendo especialmente determinante el lazo 5 (Ile404-Ala416).
8. Se han puesto a punto dos herramientas diagnósticas para la detección de viriones de RHDVb empleando los anticuerpos monoclonales 3A10 y 2D9.

9. El procedimiento inmunocromatográfico desarrollado permite la detección diferencial rápida de viriones de RHDVb, empleando muestras de exudados o tejidos de conejos obtenidos en el campo o en las granjas, con una sensibilidad y especificidad del 100%.
10. La técnica ELISA desarrollada permite un estudio cuantitativo de la presencia de viriones de RHDVb con un valor diagnóstico de 0,98 y un valor predictivo positivo o negativo del 98,1 % y del 100,0 %, respectivamente.
11. La inmunización de conejos con un péptido sintético correspondiente al lazo 1 (Asn301-Leu315) del subdominio P2 de RHDVb, conjugado a la proteína KLH no induce el sistema inmune de los conejos de forma efectiva y no protege frente a la infección por el virus.
12. La vacuna oral viva en forma de lactobacilos que expresan dominios P de distintos tipos de RHDV anclados a la pared inducen débilmente la producción de anticuerpos frente a VLPs del virus clásico (RHDV-Ast89), no siendo suficiente para proteger de la enfermedad causada por RHDVb. Tampoco se ha podido demostrar la capacidad de estos lactobacilos para colonizar el tracto digestivo de los conejos.
13. El dominio P de RHDVb fusionado a la GST empleado como antígeno vacunal es capaz de proteger al 50 % de los conejos vacunados en las condiciones utilizadas, observándose la producción de anticuerpos específicos frente a RHDVb en los animales supervivientes.
14. La vacunación con VLPs purificadas de RHDVb en presencia de adyuvante protege de la infección viral al 100 % de los animales vacunados, mostrando una inducción del sistema inmune por producción de anticuerpos específicos frente a RHDVb y dando lugar a la ausencia total de genomas virales en el hígado de los conejos vacunados.
15. La inmunización con extractos de crisálidas que expresan la VP1 de RHDVb en presencia de adyuvante protegen al 50 % de los conejos tratados, en las condiciones ensayadas, y se observa la producción de anticuerpos frente a RHDV en sueros de los supervivientes, así como una reducción del número de copias de genoma viral en el hígado con respecto a los animales sin tratar.

- 16.** Los conejos inmunizados con antígenos basados en el virus RHDVb producen anticuerpos mayoritariamente frente a VLPs de RHDVb en comparación con los observados frente a VLPs de RHDV-Ast89, demostrando las diferencias antigénicas entre ambos virus y la importancia de utilizar herramientas de detección específicas de RHDVb para determinar la presencia de anticuerpos en sueros de conejos.

Bibliografía

7. BIBLIOGRAFÍA

Abrantes J, Esteves PJ y Van Der Loo W (2008). Evidence for recombination in the major capsid gene VP60 of the rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV). *Arch Virol*, 153: 329-335.

Abrantes J, Lopes AM, Dalton KP, Melo P, Correia JJ, Ramada M, Alves PC, Parra F y Esteves PJ (2013). New Variant of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus, Portugal, 2012-2013. *Emerg Infect Dis*, 19: 1900-1902.

Abrantes J, Lopes AM y Esteves PJ (2012a). Complete genomic sequences of rabbit hemorrhagic disease virus G1 strains isolated in the European rabbit original range. *J Virol*, 86: 13886.

Abrantes J, Van Der LW, J. LP y Esteves PJ (2012b). Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review. *Vet Res*, 43: 12.

Alda F, Gaitero T, Suarez M, Merchan T, Rocha G y Doadrio I (2010). Evolutionary history and molecular epidemiology of rabbit haemorrhagic disease virus in the Iberian Peninsula and Western Europe. *BMC Evol Biol*, 10: 347.

Almanza H, Cubillos C, Angulo I, Mateos F, Caston JR, Van Der Poel WH, Vinje J, Barcena J y Mena I (2008). Self-assembly of the recombinant capsid protein of a swine norovirus into virus-like particles and evaluation of monoclonal antibodies cross-reactive with a human strain from genogroup II. *J Clin Microbiol*, 46: 3971-3979.

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

Angulo E y Villafuerte R (2003). Modelling hunting strategies for the conservation of wild rabbit populations. *Biol Conserv*, 115: 291-301.

Anonymous (1989). Doença hemorrágica a vírus do Coelho em Portugal. *Rev Port Ciênc Vet*, 84:57-58.

Araujo-Voces M (2013). Estudio y modificación del subdominio variable P2 de VP1 (RHDV-Nav10/11). Proyecto de investigación de la Licenciatura en Bioquímica. Universidad de Oviedo, Oviedo.

Argüello JL (1991). La enfermedad hemorrágica viral del conejo: vacunación y respuesta inmunológica. *Rev Sci Tech Off Intl Epiz*, 10: 459-470.

Argüello Villares JL, Llanos Pellitero A y Pérez-Ordoyo Garcia LI (1988). Enfermedad vírica hemorrágica del conejo en España. *Rev Med Vet*, 5: 645-650.

Åvall-Jääskeläinen S, Kylä-Nikkilä K, Kahala M, Miikkulainen-Lahti T y Palva A (2002). Surface display of foreign epitopes on the *Lactobacillus brevis* S-layer. *Appl Environ Microbiol*, 68: 5943-5951.

Baily JL, Dagleish MP, Graham M, Maley M y Rocchi MS (2014). RHDV variant 2 presence detected in Scotland. *Vet Rec*, 174: 411.

Barbieri I, Lavazza A, Brocchi E, König M, Capucci L (1997). Morphological, structural and antigenic modifications of rabbit haemorrhagic disease virus in the course of the disease. En *Proceedings of the 1st international symposium on caliciviruses of the European Society of Veterinary Virology*, 182-193. Weybridge, UK: European Society of Veterinary Virology and Central Veterinary Laboratory.

Bárcena J y Blanco E (2013). Design of novel vaccines based on virus-like particles or chimeric virions. *Subcell Biochem*, 68: 631-665.

Bárcena J, Guerra B, Angulo I, González J, Valcarcel F, Mata CP, Caston JR, Blanco E y Alejo A (2015). Comparative analysis of rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) and new RHDV2 virus antigenicity, using specific virus-like particles. *Vet Res*, 46: 106.

Bárcena J, Morales M, Vázquez B, Boga JA, Parra F, Lucientes J, Pages-Mante A, Sánchez-Vizcaíno JM, Blasco R y Torres TM (2000). Horizontal transmissible protection against myxomatosis and rabbit hemorrhagic disease by using a recombinant myxoma virus. *J Virol*, 74: 1114-1123.

Bárcena J, Verdaguer N, Roca R, Morales M, Angulo I, Risco C, Carrascosa JL, Torres JM y Castón JR (2004). The coat protein of Rabbit hemorrhagic disease virus contains a molecular switch at the N-terminal region facing the inner surface of the capsid. *Virology*, 322: 118-134.

Bertagnoli S, Gelfi J, Le Gall G, Boilletot E, Vautherot JF, Rasschaert D, Laurent S, Petit F, Boucraut-Baralon C y Milon A (1996). Protection against myxomatosis and rabbit viral hemorrhagic disease with recombinant myxoma viruses expressing rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein. *J Virol*, 70: 5061-5066.

Bertolotti-Ciarlet A, White LJ, Chen R, Prasad BV y Estes MK (2002). Structural requirements for the assembly of Norwalk virus-like particles. *J Virol*, 76: 4044-4055.

Bhella D, Gatherer D, Chaudhry Y, Pink R y Goodfellow IG (2008). Structural insights into calicivirus attachment and uncoating. *J Virol*, 82: 8051-8058.

Bhella D y Goodfellow IG (2011). The cryo-electron microscopy structure of feline calicivirus bound to junctional adhesion molecule A at 9-Angstrom resolution reveals receptor-induced flexibility and two distinct conformational changes in the capsid protein VP1. *J Virol*, 85: 11381-11390.

Bode C, Zhao G, Steinhagen F, Kinjo T y Klinman DM (2011). CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert Rev Vaccines*,

Boga JA, Casais R, Marin MS, Martín-Alonso JM, Carmenes RS, Prieto M y Parra F (1994). Molecular cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the capsid protein gene from rabbit haemorrhagic disease virus (Spanish isolate AST/89). *J Gen Virol*, 75: 2409-2413.

Boga JA, Marín MS, Casais R, Prieto M y Parra F (1992). In vitro translation of a subgenomic mRNA from purified virions of the Spanish field isolate AST/89 of rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV). *Virus Res*, 26: 33-40.

Boga JA, Martín Alonso JM, Casais R y Parra F (1997). A single dose immunization with rabbit haemorrhagic disease virus major capsid protein produced in *Saccharomyces cerevisiae* induces protection. *J Gen Virol*, 78: 2315-2318.

Boniotti B, Wirblich C, Sibilía M, Meyers G, Thiel HJ y Rossi C (1994). Identification and characterization of a 3C-like protease from rabbit hemorrhagic disease virus, a calicivirus. *J Virol*, 68: 6487-6495.

Branco M, Ferrand N y Monnerot M (2000). Phylogeography of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in the Iberian Peninsula inferred from RFLP analysis of the cytochrome b gene. *Heredity (Edinb)*, 85 Pt 4: 307-317.

Branco M, Monnerot M, Ferrand N y Templeton A (2002). Postglacial dispersal of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) on the Iberian *Evolution*, 56: 792-803.

Calvete C, Calvo JH y Sarto P (2012). Detección de una nueva variante del virus de la enfermedad hemorrágica en conejos silvestres en España. *En Proceedings of XXXVII Symposium de ASESCU*, 112-115.

Calvete C, Mendoza M, Alcaraz A, Sarto MP, Jimenez-De-Baguess MP, Calvo AJ, Monroy F y Calvo JH (2018). Rabbit haemorrhagic disease: Cross-protection and comparative pathogenicity of GI.2/RHDV2/b and GI.1b/RHDV lagoviruses in a challenge trial. *Vet Microbiol*, 219: 87-95.

Calvete C, Sarto P, Calvo AJ, Monroy F y Calvo JH (2014). Could the new rabbit haemorrhagic disease virus variant (RHDVB) be fully replacing classical RHD strains in the Iberian Peninsula? *World Rabbit Sci*, 22: 91.

Cancellotti FM y Renzi M (1991). Epidemiology and current situation of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European Brown Hare Syndrome. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, 10: 409-422.

Capucci L, Cavadini P, Schiavitto M, Lombardi G y Lavazza A (2017). Increased pathogenicity in rabbit haemorrhagic disease virus type 2 (RHDV2). *Vet Rec*, 180: 426.

Capucci L, Chasey D, Lavazza A y Westcott D (1996). Preliminary characterization of a non-haemagglutinating strain of rabbit haemorrhagic disease virus from the United Kingdom. *Zentralbl Veterinarmed B*, 43: 245-250.

Capucci L, Fallacara F, Grazioli S, Lavazza A, Pacciarini ML y Brocchi E (1998). A further step in the evolution of rabbit hemorrhagic disease virus: the appearance of the first consistent antigenic variant. *Virus Res*, 58: 115-126.

Capucci L, Frigoli G, Ronshold L, Lavazza A, Brocchi E y Rossi C (1995). Antigenicity of the rabbit hemorrhagic disease virus studied by its reactivity with monoclonal antibodies. *Virus Res*, 37: 221-238.

Capucci L, Nardin A y Lavazza A (1997). Seroconversion in an industrial unit of rabbits infected with a non-pathogenic rabbit haemorrhagic disease-like virus. *Vet Rec*, 140: 647-650.

Capucci L, Scicluna M y Lavazza A (1991). Viral Haemorrhagic Disease of Rabbits and the European Brown Hare Syndrome. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, 10: 347-370.

Castañón S, Marín MS, Martín-Alonso JM, Boga JA, Casais R, Humara JM, Ordás RJ y Parra F (1999). Immunization with potato plants expressing VP60 protein protects against rabbit hemorrhagic disease virus. *J Virol*, 73: 4452-4455.

Cavadini P, Molinari S, Pezzoni G, Chiari M, Brocchi E, Lavazza A, Capucci L (2016). Identification of a new non-pathogenic lagovirus in brown hares (*Lepus europeus*). En: *Kelly P, Phillips S, Smith A and Browning C (ed). 5th World Lagomorph Conference, 81.* California State University, Stanislaus, Turlock, CA, USA.

Chasey D, Lucas M, Westcott D y Williams M (1992). European brown hare syndrome in the U.K.; a calicivirus related to but distinct from that of viral haemorrhagic disease in rabbits. *Arch Virol*, 124: 363-370.

Chen L, Liu G, Ni Z, Yu B, Yun T, Song Y, Hua J, Li S y Chen J (2009). The minor structural protein VP2 in rabbit hemorrhagic disease virus down-regulates the expression of the viral capsid protein VP60. *J Gen Virol*, 90: 2952-2955.

Chen R, Neill JD, Estes MK y Prasad BV (2006). X-ray structure of a native calicivirus: Structural insights into antigenic diversity and host specificity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 8048-8053.

Choi JM, Hutson AM, Estes MK y Prasad BVV (2008). Atomic resolution structural characterization of recognition of histo-blood group antigens by Norwalk virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 9175-9180.

Clarke IN y Lambden PR (1997). The molecular biology of caliciviruses. *J Gen Virol*, 78: 291-301.

Collins BJ, White JR, Lenghaus C, Boyd V y Westbury HA (1995). A competition ELISA for the detection of antibodies to rabbit haemorrhagic disease virus. *Vet Microbiol*, 43: 85-96.

Cooke BD (2002). Rabbit haemorrhagic disease: field epidemiology and the management of wild rabbit populations. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, 21: 347-358.

Cooke BD, Robinson AJ, Merchant JC, Nardin A y Capucci L (2000). Use of ELISAs in field studies of rabbit haemorrhagic disease (RHD) in Australia. *Epidemiol Infect*, 124: 563-576.

Cortes-Perez NG, Lozano-Ojalvo D, Maiga MA, Hazebrouck S y Adel-Patient K (2017). Intragastric administration of *Lactobacillus casei* BL23 induces regulatory FoxP3+RORgammat+ T cells subset in mice. *Benef Microbes*, 8: 433-438.

Crisci E, Almanza H, Mena I, Cordoba L, Gomez-Casado E, Caston JR, Fraile L, Barcena J y Montoya M (2009). Chimeric calicivirus-like particles elicit protective anti-viral cytotoxic responses without adjuvant. *Virology*, 387: 303-312.

Crisci E, Barcena J y Montoya M (2012). Virus-like particles: the new frontier of vaccines for animal viral infections. *Vet Immunol Immunopathol*, 148: 211-225.

Crisci E, Fraile L, Novellas R, Espada Y, Cabezón R, Martínez J, Cordoba L, Bárcena J, Benitez-Ribas D y Montoya M (2015). In vivo tracking and immunological properties of pulsed porcine monocyte-derived dendritic cells. *Mol Immunol*, 63: 343-354.

Crisci JL, Poh YP, Bean A, Simkin A y Jensen JD (2012). Recent progress in polymorphism-based population genetic inference. *J Hered*, 103: 287-296.

Dalton KP, Abrantes J, Lopes AM, Nicieza I, Álvarez Á, Esteves PJ y Parra F (2015). Complete genome sequence of two rabbit hemorrhagic disease virus variant b isolates detected on the Iberian Peninsula. *Arch Virol*, 160: 877-881.

Dalton KP, Arnal JL, Benito AA, Chacón G, Martín Alonso JM y Parra F (2018a). Conventional and real time RT-PCR assays for the detection and differentiation of variant rabbit hemorrhagic disease virus (RHDVb) and its recombinants. *J Virol Methods*, 251: 118-122.

Dalton KP, Balseiro A, Juste RA, Podadera A, Nicieza I, Del Llano D, González R, Martín Alonso JM, Prieto JM, Parra F y Casais R (2018b). Clinical course and pathogenicity of variant rabbit haemorrhagic disease virus in experimentally infected adult and kit rabbits: Significance towards control and spread. *Vet Microbiol*, 220: 24-32.

Dalton KP, Nicieza I, Abrantes J, Esteves PJ y Parra F (2014). Spread of new variant RHDV in domestic rabbits on the Iberian Peninsula. *Vet Microbiol*, 169: 67-73.

Dalton KP, Nicieza I, Balseiro A, Muguera MA, Rosell JM, Casais R, Álvarez Á y Parra F (2012). Variant rabbit hemorrhagic disease virus in young rabbits, Spain. *Emerg Infect Dis*, 18: 2009-2012.

Dalton KP, Nicieza I, Podadera A, De Llano D, Martín Alonso JM, De Los Toyos JR, García Ocaña M, Vázquez-Villa F, Velasco B, Landeta O y Parra F (2017). Fast specific field detection of RHDVb. *Transbound Emerg Dis*, 65: 232-234.

Dalton KP, Podadera A, Granda V, Nicieza I, Del Llano D, González R, De Los Toyos JR, García Ocaña M, Vázquez F, Martín Alonso JM, Prieto JM, Parra F y Casais R (2018c). ELISA for detection of variant rabbit haemorrhagic disease virus RHDV2 antigen in liver extracts. *J Virol Methods*, 251: 38-42.

Daughenbaugh KF, Fraser CS, Hershey JW y Hardy ME (2003). The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. *EMBO J*, 22: 2852-2859.

De Aizpurua HJ y Russell-Jones GJ (1988). Oral vaccination. Identification of classes of proteins that provoke an immune response upon oral feeding. *J Exp Med*, 167: 440-451.

Delibes-Mateos M, Delibes M, Ferreras P y Villafuerte R (2008a). Key role of European rabbits in the conservation of the Western Mediterranean basin hotspot. *Conserv Biol*, 22: 1106-1117.

Delibes-Mateos M, Ferreira C, Carro F, Escudero MA y Gortazar C (2014). Ecosystem effects of variant rabbit hemorrhagic disease virus, Iberian Peninsula. *Emerg Infect Dis*, 20: 2166-2168.

Delibes-Mateos M, Ferreras P y Villafuerte R (2008b). Rabbit populations and game management: the situation after 15 years of rabbit haemorrhagic disease in central-southern Spain. *Biodivers Conserv*, 17: 559-574.

Delibes-Mateos M, Redpath SM, Angulo E, Ferreras P y Villafuerte R (2007). Rabbits as a keystone species in southern Europe. *Biol Conserv*, 137: 149-156.

Deng Y, Batten CA, Liu BL, Lambden PR, Elschner M, Gunther H, Otto P, Schnurch P, Eichhorn W, Herbst W y Clarke IN (2003). Studies of epidemiology and seroprevalence of bovine noroviruses in Germany. *J Clin Microbiol*, 41: 2300-2305.

Deng Z, Geng Y, Wang K, Yu Z, Yang PO, Yang Z, He C, Huang C, Yin L, He M, Tang L y Lai W (2019). Adjuvant effects of interleukin-2 co-expression with VP60 in an oral vaccine delivered by attenuated *Salmonella typhimurium* against rabbit hemorrhagic disease. *Vet Microbiol*, 230: 49-55.

Diemert DJ, Freire J, Valente V, Fraga CG, Talles F, Grahek S, Campbell D, Jariwala A, Periago MV, Enk M, Gazzinelli MF, Bottazzi ME, Hamilton R, Brelsford J, Yakovleva A, Li G, Peng J, Correa-Oliveira R, Hotez P y Bethony J (2017). Safety and immunogenicity of the Na-GST-1 hookworm vaccine in Brazilian and American adults. *PLoS Negl Trop Dis*, 11: e0005574.

Duarte M, Carvalho C, Bernardo S, Barros SV, Benevides S, Flor L, Monteiro M, Marques I, Henriques M, Barros SC, Fagulha T, Ramos F, Luis T y Fevereiro M (2015). Rabbit haemorrhagic disease virus 2 (RHDV2) outbreak in Azores: Disclosure of common genetic markers and phylogenetic segregation within the European strains. *Infect Genet Evol*, 35: 163-171.

Eden JS, Kovaliski J, Duckworth JA, Swain G, Mahar JE, Strive T y Holmes EC (2015a). Comparative phylodynamics of rabbit hemorrhagic disease virus in Australia and New Zealand. *J Virol*, 89: 9548-9558.

Eden JS, Read AJ, Duckworth JA, Strive T y Holmes EC (2015b). Resolving the origin of rabbit hemorrhagic disease virus: Insights from an investigation of the viral stocks released in Australia. *J Virol*, 89: 12217-12220.

Fao (2017). FAOSTAT-Agriculture. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL/visualize>. 2014.

Farkas T, Sestak K, Wei C y Jiang X (2008). Characterization of a rhesus monkey calicivirus representing a new genus of Caliciviridae. *J Virol*, 54: 5408-5416.

Fernández-Fernández MR, Mouriño M, Rivera J, Rodríguez F, Plana-Durán J y García JA (2001). Protection of rabbits against rabbit hemorrhagic disease virus by immunization with the VP60 protein expressed in plants with a potyvirus-based vector. *Virology*, 280: 283-291.

Fernández-Sánchez A, García-Ocaña M y De Los Toyos JR (2009). Mouse monoclonal antibodies to pneumococcal C-polysaccharide backbone show restricted usage of VH-DH-JH gene segments and share the same kappa chain. *Immunol Lett*, 123: 125-131.

Fernandez E, Toledo JR, Chiong M, Parra F, Rodriguez E, Montero C, Mendez L, Capucci L y Farnos O (2011). Single dose adenovirus vectored vaccine induces a potent and long-lasting immune response against rabbit hemorrhagic disease virus after parenteral or mucosal administration. *Vet Immunol Immunopathol*, 142: 179-188.

Fernandez E, Toledo JR, Mendez L, Gonzalez N, Parra F, Martin-Alonso JM, Limonta M, Sanchez K, Cabrales A, Estrada MP, Rodriguez-Mallon A y Farnos O (2013). Conformational and thermal stability improvements for the large-scale production of yeast-derived rabbit hemorrhagic disease virus-like particles as multipurpose vaccine. *PLoS One*, 8: e56417.

Ferrand N (1995). Variação genética de proteínas em populações de coelho (*Oryctolagus cuniculus*). Análise da diferenciação subespecífica, subestruturação, expansão geográfica e domesticação. Tesis doctoral, Universidad de Porto, Portugal.

Ferreira C (2012). Relationships between predation risk, disease and fitness in the wild rabbit: management implications, Universidad de Castilla-La Mancha.

Foligne B, Nutten S, Grangette C, Dennin V, Goudercourt D, Poiret S, Dewulf J, Brassart D, Mercenier A y Pot B (2007). Correlation between *in vitro* and *in vivo* immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World J Gastroenterol*, 13: 236-243.

Forrester NL, Moss SR, Turner SL, Schirrneier H y Gould EA (2008). Recombination in rabbit haemorrhagic disease virus: Possible impact on evolution and epidemiology. *Virology*, 376: 390-396.

Fuchs A y Weissenböck H (1992). Comparative histopathological study of rabbit haemorrhagic disease (RHD) and European brown hare syndrome (EBHS). *J Comp Pathol*, 107: 103-113.

Gall A, Hoffmann B, Teifke JP, Lange B y Schirrneier H (2007). Persistence of viral RNA in rabbits which overcome an experimental RHDV infection detected by a highly sensitive multiplex real-time RT-PCR. *Vet Microbiol*, 120: 17-32.

Gall A y Schirrneier H (2006). Persistence of rabbit haemorrhagic disease virus genome in vaccinated rabbits after experimental infection. *J Vet Med B*, 53: 358-362.

Gálvez Bravo L, Belliure J y Rebollo S (2009). European rabbits as ecosystem engineers: warrens increase lizard density and diversity. *Biodivers Conserv*, 18: 869-885.

Gálvez L, López-Pintor A, De Miguel JM, Alonso G, Rueda M, Rebollo S y Gómez-Sal A (2008). Ecosystem engineering effects of European rabbits in a Mediterranean habitat. En *Lagomorph Biology: Evolution, Ecology, and Conservation*. Alves PC, Ferrand N and Hackländer K. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 125-139.

Geraldes A, Ferrand N y Nachman MW (2006). Contrasting patterns of introgression at X-linked loci across the hybrid zone between subspecies of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Genetics*, 173: 919-933.

Gil F, Pérez-Filgueira M, Barderas MG, Pastor-Vargas C, Alonso C, Vivanco F y Escribano JM (2011). Targeting antigens to an invariant epitope of the MHC Class II DR molecule potentiates the immune response to subunit vaccines. *Virus Res*, 155: 55-60.

Gil F, Titarenko E, Terrada E, Arcalis E y Escribano JM (2006). Successful oral prime-immunization with VP60 from rabbit haemorrhagic disease virus produced in transgenic plants using different fusion strategies. *Plant Biotechnol J*, 4: 135-143.

Gilliland G, Berman HM, Weissig H, Shindyalov IN, Westbrook J, Bourne PE, Bhat TN y Feng Z (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res*, 28: 235-242.

Gomez-Sebastian S, Lopez-Vidal J y Escribano JM (2014). Significant productivity improvement of the baculovirus expression vector system by engineering a novel expression cassette. *PLoS One*, 9: e96562.

Goodfellow I, Chaudhry Y, Gioldasi I, Gerondopoulos A, Natoni A, Labrie L, Laliberte JF y Roberts L (2005). Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and eIF4E. *EMBO Rep*, 6: 968-972.

Gortázar C, Villafuerte R, Fernández D, Cooke B, Jordán G, Pagés A, Feliu C, Angulo E, Lucientes J (2000). Enfermedades del conejo silvestre. En: *Enfermedades del conejo* (Ed.: Rossell JM), 2: 455-512. Barcelona: Ediciones Mundi-Prensa.

Granzow H, Weiland F, Strebelow HG, Liu CM y Schirrmeyer H (1996). Rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV): Ultrastructure and biochemical studies of typical and core-like particles present in liver homogenates. *Virus Res*, 41: 163-172.

Grasa JR y Malo M (2012). Enfermedad vírica hemorrágica: nueva variante. En *Proceedings of XXXVII Symposium de ASESCU*, Barbastro, España. Editorial Agrícola Española S.A.

Green KY, Ando T, Balayan MS, Berke T, Clarke IN, Estes MK, Matson DO, Nakata S, Neill JD, Studdert MJ y Thiel HJ (2000). Taxonomy of the caliciviruses. *J Infect Dis*, 181 Supl: 322-330.

Grezel D, Capron M, Grzych JM, Fontaine J, Lecocq JP y Capron A (1993). Protective immunity induced in rat schistosomiasis by a single dose of the Sm28GST recombinant antigen: effector mechanisms involving IgE and IgA antibodies. *Eur J Immunol*, 23: 454-460.

Guijarro-Pardo E, Gomez-Sebastian S y Escribano JM (2017). In vivo production of recombinant proteins using occluded recombinant AcMNPV-derived baculovirus vectors. *J Virol Methods*, 250: 17-24.

Guo H, Zhu J, Tan Y, Li C, Chen Z, Sun S y Liu G (2016). Self-assembly of virus-like particles of rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein expressed in *Escherichia coli* and their immunogenicity in rabbits. *Antiviral Res*, 131: 85-91.

Gupta S, Bhandari YP, Reddy MV, Harinath BC y Rathaur S (2005). Setaria cervi: immunoprophylactic potential of glutathione-S-transferase against filarial parasite Brugia malayi. *Exp Parasitol*, 109: 252-255.

Hall RN, Mahar JE, Haboury S, Stevens V, Holmes EC y Strive T (2015). Emerging rabbit hemorrhagic disease virus 2 (RHDVb), Australia. *Emerg Infect Dis*, 21: 2276-2278.

Hanniffy S, Wiedermann U, Repa A, Mercenier A, Daniel C, Fioramonti J, Tlaskolova H, Kozakova H, Israelsen H, Madsen S, Vrang A, Hols P, Delcour J, Bron P, Kleerebezem M y Wells J (2004). Potential and opportunities for use of recombinant lactic acid bacteria in human health. *Adv Appl Microbiol*, 56: 1-64.

Henning J, Meers J, Davies PR y Morris RS (2005). Survival of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) in the environment. *Epidemiol Infect*, 133: 719-730.

Hicks AL y Duffy S (2012). One misdated sequence of rabbit hemorrhagic disease virus prevents accurate estimation of its nucleotide substitution rate. *BMC Evol Biol*, 12: 74-85.

Hirakawa H (2001). Coprophagy in leporids and other mammalian herbivores. *Mammal Rev*, 31: 61-80.

Hoang PM, Cho S, Kim KE, Byun SJ, Lee TK y Lee S (2015). Development of *Lactobacillus paracasei* harboring nucleic acid-hydrolyzing 3D8 scFv as a preventive probiotic against murine norovirus infection. *Appl Microbiol Biotechnol*, 99: 2793-2803.

Hu B, Wang F, Fan Z, Song Y, Abrantes J, Zuo Y y Esteves PJ (2017). Recombination between G2 and G6 strains of rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) in China. *Arch Virol*, 162: 269-272.

Hu Z, Tian X, Zhai Y, Xu W, Zheng D y Sun F (2010). Cryo-electron microscopy reconstructions of two types of wild rabbit hemorrhagic disease viruses characterized the structural features of Lagovirus. *Protein & Cell*, 1: 48-58.

Huang HB (1991). Vaccination against and immune response to viral haemorrhagic disease of rabbits: a review of research in the People's Republic of China. *Rev Sci Tech Int Off Epiz*, 10: 481-498.

Huang Q, Yu W y Hu T (2016). Potent antigen-adjuvant delivery system by conjugation of *Mycobacterium tuberculosis* Ag85B-HspX fusion protein with arabinogalactan-Poly(I:C) conjugate. *Bioconjugate Chem*, 27: 1165-1174.

Jankovic I, Ventura M, Meylan V, Rouvet M, Elli M y Zink R (2003). Contribution of aggregation-promoting factor to maintenance of cell shape in *Lactobacillus gasseri* 4B2. *J Bacteriol*, 185: 3288-3296.

Kadaré G y Haenni AL (1997). Virus-encoded RNA helicases. *J Virol*, 71: 2583-2590.

Kantele A, Häkkinen MP, Zivny J, Elson CO, Mestecky J y Kantele JM (2011). Humoral immune response to keyhole limpet haemocyanin, the protein carrier in cancer vaccines. *Clin Dev Immunol*, 2011: 1-6.

Kato T, Kajikawa M, Maenaka K y Park EY (2010). Silkworm expression system as a platform technology in life science. *Appl Microbiol Biotechnol*, 85: 459-470.

Katpally U, Voss NR, Cavazza T, Taube S, Rubin JR, Young VL, Stuckey J, Ward VK, Virgin HW, Wobus CE y Smith TJ (2010). High-resolution cryo-electron microscopy structures of MNV-1 and RHDV reveals marked flexibility in the receptor binding domains. *J Virol*, 84: 5836-5841.

Katpally U, Wobus CE, Dryden K, Virgin HW y Smith TJ (2008). Structure of antibody-neutralized murine norovirus and unexpected differences from viruslike particles. *J Virol*, 82: 2079-2088.

Kerr PJ, Kitchen A y Holmes EC (2009). The origin and phylodynamics of rabbit hemorrhagic disease virus. *J Virol*, 83: 12129-12138.

Kinnear MW y Linde CC (2010). Capsid gene divergence in rabbit haemorrhagic disease virus. *J Gen Virol*, 91: 174-181.

Koho T, Ihalainen TO, Stark M, Uusi-Kerttula H, Wieneke R, Rahikainen R, Blazevic V, Marjomäki V, Tampé R, Kulomaa MS y Hytönen VP (2015). His-tagged norovirus-like particles: A versatile platform for cellular delivery and surface display. *Eur J Pharm Biopharm*, 96: 22-31.

Kolawole AO, Li M, Xia C, Fischer AE, Giacobbi NS, Rippinger CM, Proescher JBG, Wu SK, Bessling SL, Gamez M, Yu C, Zhang R, Mehoke TS, Pipas JM, Wolfe JT, Lin JS, Feldman AB, Smith TJ y Wobus CE (2014). Flexibility in surface-exposed loops in a virus capsid mediates escape from antibody neutralization. *J Virol*, 88: 4543-4557.

Kong D, Liu J, Jiang Q, Yu Z, Hu X, Guo D, Huang Q, Jiao M y Qu L (2016). Production, characterization, and epitope mapping of monoclonal antibodies against different subtypes of rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV). *Sci Rep*, 6: 20857.

Krüger C, Hu Y, Pan Q, Marcotte H, Hultberg A, Delwar D, Van Dalen PJ, Pouwels PH, Leer RJ, Kelly CG, Van Dollenweerd C, Ma JK y Hammarström L (2002). *In situ* delivery of passive immunity by lactobacilli producing single-chain antibodies. *Nat Biotechnol*, 20: 702-706.

Krupovic M y Koonin EV (2017). Multiple origins of viral capsid proteins from cellular ancestors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 114: E2401-E2410.

Kushnir N, Streatfield SJ y Yusibov V (2012). Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine*, 31: 58-83.

Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

L'homme Y, Sansregret R, Plante-Fortier E, Lamontagne AM, Ouardani M, Lacroix G y Simard C (2009). Genomic characterization of swine caliciviruses representing a new genus of *Caliciviridae*. *Virus Genes*, 39: 66-75.

Langeveld JP, Casal JI, Osterhaus ADME, Cortés E, De Swart R, Vela C, Dalsgaard K, Puijk WC, Schaaper WMM y Meloen RH (1994). First peptide vaccine providing protection against viral infection in the target animal: studies of canine parvovirus in dogs. *J Virol*, 68: 4506-4513.

Langeveld JPM, Kamstrup S, Uttenthal A, Strandbygaard B, Vela C, Dalsgaard K, Beekman NJCM, Meloen RH y Casal JI (1995). Full protection in mink against mink enteritis virus with new generation canine parvovirus vaccines based on synthetic peptide or recombinant protein. *Vaccine*, 13: 1033-1037.

Laurent S, Vautherot JF, Madelaine MF, Le GG y Rasschaert D (1994). Recombinant rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein expressed in baculovirus self-assembles into viruslike particles and induces protection. *J Virol*, 68: 6794-6798.

Lavazza A, Scicluna MT y Capucci L (1996). Susceptibility of hares and rabbits to the European brown hare syndrome virus (EBHSV) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) under experimental conditions. *J Vet Med B*, 43: 401-410.

Le Gall-Reculé G, Lavazza A, Marchandeu S, Bertagnoli S, Zwingelstein F, Cavadini P, Martinelli N, Lombardi G, Guerin JL, Lemaitre E, Decors A, Boucher S, Le Normand B y Capucci L (2013). Emergence of a new lagovirus related to rabbit haemorrhagic disease virus. *Vet Res*, 44: 81.

Le Gall-Reculé G, Zwingelstein F, Boucher S, Le Normand B, Plassiart G, Portejoie Y, Decors A, Bertagnoli S, Guerin JL y Marchandeu S (2011a). Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France. *Vet Rec*, 168: 137-138.

Le Gall-Reculé G, Zwingelstein F, Fages MP, Bertagnoli S, Gelfi J, Aubineau J, Roobrouck A, Botti G, Lavazza A y Marchandeu S (2011b). Characterisation of a non-pathogenic and non-protective infectious rabbit lagovirus related to RHDV. *Virology*, 410: 395-402.

Le Gall-Reculé G, Zwingelstein F, Laurent S, De Boisseson C, Portejoie Y y Rasschaert D (2003). Phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease virus in France between 1993 and 2000, and the characterisation of RHDV antigenic variants. *Arch Virol*, 148: 65-81.

Le Pendu J, Abrantes J, Bertagnoli S, Guitton JS, Le Gall-Reculé G, Lopes AM, Marchandeu S, Alda F, Almeida T, Celio AP, Barcena J, Burmakina G, Blanco E, Calvete C, Cavadini P, Cooke B, Dalton K, Delibes-Mateos M, Deptula W, Eden JS, Wang F, Ferreira CC, Ferreira P, Foronda P, Goncalves D, Gavier-Widen D, Hall R, Hukowska-Szematowicz B, Kerr P, Kovaliski J, Lavazza A, Mahar J, Malogolovkin A, Marques RM, Marques S, Martin-Alonso A, Monterroso P, Moreno S, Mutze G, Neimanis A, Niedzwiedzka-Rystwej P, Peacock D, Parra F, Rocchi M, Rouco C, Ruvoen-Clouet N, Silva E, Silverio D, Strive T, Thompson G, Tokarz-Deptula B y Esteves P (2017). Proposal for a unified classification system and nomenclature of lagoviruses. *J Gen Virol*, 98: 1658-1666.

Lebas F, Coudert P, De Rochambeau H y Thèbault RG (1996). El conejo. Cría y patología. *Colección FAO: Producción y sanidad animal*.

Lee B, Tachon S, Eigenheer RA, Phinney BS y Marco ML (2015). *Lactobacillus casei* low-temperature, dairy-associated proteome promotes persistence in the mammalian digestive tract. *J Proteome Res*, 14: 3136-3147.

Lenoir M, Del Carmen S, Cortes-Perez NG, Lozano-Ojalvo D, Muñoz-Provencio D, Chain F, Langella P, De Moreno De Leblanc A, Leblanc JG y Bermúdez-Humarán LG (2016). *Lactobacillus casei* BL23 regulates Treg and Th17 T-cell populations and reduces DMH-associated colorectal cancer. *J Gastroenterol*, 51: 862-873.

Leuthold MM (2016). Calicivirus structural studies: Investigations into viral capsid interactions with host factors, synthetic compounds and antibodies. Inaugural-Dissertation. University of Heidelberg, Alemania.

Leuthold MM, Dalton KP y Hansman GS (2015). Structural analysis of a rabbit hemorrhagic disease virus binding to histo-blood group antigens. *J Virol*, 89: 2378-2387.

Leuthold MM, Koromyslova AD, Singh BK, Hansman GS (2016). Production of human Norovirus protruding domains in *E. coli* for X-ray crystallography. *J Vis Exp* (110).

Lindesmith LC, Donaldson EF, Beltramello M, Pintus S, Corti D, Swanstrom J, Debbink K, Jones TA, Lanzavecchia A y Baric RS (2014). Particle conformation regulates antibody access to a conserved GII.4 Norovirus blockade epitope. *J Virol*, 88: 8826-8842.

Liu GQ, Ni Z, Yun T, Yu B, Zhu JM, Hua JG y Chen JP (2008). Rabbit hemorrhagic disease virus poly(A) tail is not essential for the infectivity of the virus and can be restored in vivo. *Arch. Virol*, 153: 939-944.

Liu SJ, Xue HP, Pu BQ y Qian NH (1984). A new viral disease in rabbits. *Anim Husb Vet Med*, 16: 253-255.

Lochridge VP y Hardy ME (2007). A single-amino-acid substitution in the P2 domain of VP1 of murine norovirus is sufficient for escape from antibody neutralization. *J Virol*, 81: 12316-12322.

Lochridge VP, Jutila KL, Graff JW y Hardy ME (2005). Epitopes in the P2 domain of norovirus VP1 recognized by monoclonal antibodies that block cell interactions. *J Gen Virol*, 86: 2799-2806.

Lopes AM, Correia J, Abrantes J, Melo P, Ramada M, Magalhaes MJ, Alves PC y Esteves PJ (2015a). Is the new variant RHDV replacing genogroup 1 in Portuguese wild rabbit populations? *Viruses*, 7: 27-36.

Lopes AM, Dalton KP, Magalhães MJ, Parra F, Esteves PJ, Holmes EC y Abrantes J (2015b). Full genomic analysis of new variant rabbit hemorrhagic disease virus revealed multiple recombination events. *J Gen Virol*, 96: 1309-1319.

Lopes AM, Silvério D, Magalhães MJ, Areal H, Alves PC, Esteves PJ y Abrantes J (2017). Characterization of old RHDV strains by complete genome sequencing identifies a novel genetic group. *Sci Rep*, 19: 13599.

López-Vidal J, Gómez-Sebastián S, Bárcena J, Del Carmen Nuñez M, Martínez-Alonso D, Dudognon B, Guijarro E y Escribano JM (2015). Improved production efficiency of virus-like particles by the baculovirus expression vector system. *PLoS ONE*, 10: e0140039.

López Vázquez A, Martín Alonso JM, Casais R, Boga JA y Parra F (1998). Expression of enzymatically active rabbit hemorrhagic disease virus RNA-dependent RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J Virol*, 72: 2999-3004.

López Vázquez A, Martín Alonso JM y Parra F (2001). Characterisation of the RNA-dependent RNA polymerase from Rabbit hemorrhagic disease virus produced in *Escherichia coli*. *Arch Virol*, 146: 59-69.

Luque D, Gonzalez JM, Gomez-Blanco J, Marabini R, Chichon J, Mena I, Angulo I, Carrascosa JL, Verdaguer N, Trus BL, Barcena J y Caston JR (2012). Epitope insertion at the N-terminal molecular switch of the rabbit hemorrhagic disease virus T = 3 capsid protein leads to larger T = 4 capsids. *J Virol*, 86: 6470-6480.

Machín Á, Martín Alonso JM y Parra F (2001). Identification of the amino acid residue involved in rabbit hemorrhagic disease virus VPg uridylylation. *J Biol Chem*, 276: 27787-27792.

Mahar JE, Hall RN, Peacock D, Kovaliski J, Piper M, Mourant R, Huang N, Campbell S, Gu X, Read A, Urakova N, Cox T, Holmes EC y Strive T (2018). Rabbit hemorrhagic disease virus 2 (RHDV2; GI.2) is replacing endemic strains of RHDV in the Australian landscape within 18 months of its arrival. *J Virol*, 92: e01374-01317.

MAPAMA, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2018). El sector cunícola en cifras: principales indicadores económicos. Catálogo de publicaciones de la Administración General del Estado: <http://publicacionesoficiales.boe.es/>.

Marcatili P, Rosi A y Tramontano A (2008). PIGS: automatic prediction of antibody structures. *Bioinformatics*, 24: 1953-1954.

Marcato PS, Benazzi C, Vecchi G, Galeotti M, Della SL, Sarli G, Lucidi P y Della Salda L (1991). Clinical and pathological features of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, 10: 371-392.

Marchandeu S, Le Gall-Recule G, Bertagnoli S, Aubineau J, Botti G y Lavazza A (2005). Serological evidence for a non-protective RHDV-like virus. *Vet Res*, 36: 53-62.

Marcotte H, Ferrari S, Cesena C, Hammarström L, Morelli L, Pozzi G y Oggioni MR (2004). The aggregation-promoting factor of *Lactobacillus crispatus* M247 and its genetic locus. *J Appl Microbiol*, 97: 749-756.

Marcotte H, Pant N y Hammarström L (2008). Engineered lactobody-producing lactobacilli: A novel form of therapy against rotavirus infection. *Future Virol*, 3: 327-341.

Marín MS, Casais R, Alonso JM y Parra F (2000). ATP binding and ATPase activities associated with recombinant rabbit hemorrhagic disease virus 2C-like polypeptide. *J Virol*, 74: 10846-10851.

Marín MS, Martín Alonso JM, Pérez Ordoyo García LI, Antonio Boga J, Argüello-Villares JL, Casais R, Venugopal K, Jiang W, Gould EA y Parra F (1995). Immunogenic properties of rabbit haemorrhagic disease virus structural protein VP60 expressed by a recombinant baculovirus: an efficient vaccine. *Virus Res*, 39: 119-128.

Martín Alonso JM, Casais R, Boga JA y Parra F (1996). Processing of rabbit hemorrhagic disease virus polyprotein. *J Virol*, 70: 1261-1265.

Martín MC, Alonso JC, Suárez JE y Alvarez MA (2000). Generation of food-grade recombinant lactic acid bacterium strains by site-specific recombination. *Appl Environ Microbiol*, 66: 2599-2604.

Martín MC, Fernández M, Martín-Alonso JM, Parra F, Boga JA y Alvarez MA (2004). Nisin-controlled expression of Norwalk virus VP60 protein in *Lactobacillus casei*. *FEMS Microbiol Lett*, 237: 385-391.

Martín MC, Pant N, Ladero V, Günaydın G, Andersen KK, Álvarez B, Martínez N, Alvarez MA, Hammarström L y Marcotte H (2011). Integrative expression system for delivery of antibody fragments by lactobacilli. *Appl Environ Microbiol*, 77: 2174-2179.

Mateu MG (1995). Antibody recognition of picornaviruses and escape from neutralization: a structural view. *Virus Res*, 38: 1-24.

Mateu MG (2013). Assembly, stability and dynamics of virus capsids. *Arch Biochem Biophys*, 531: 65-79.

McIntosh MT, Behan SC, Mohamed FM, Lu Z, Moran KE, Burrage TG, Neilan JG, Ward GB, Botti G, Capucci L y Metwally SA (2007). A pandemic strain of calicivirus threatens rabbit industries in the Americas. *Virol J*, 4: 96.

Meyers G, Wirblich C y Thiel HJ (1991a). Genomic and subgenomic RNAs of rabbit hemorrhagic disease virus are both protein-linked and packaged into particles. *Virology*, 184: 677-686.

Meyers G, Wirblich C y Thiel HJ (1991b). Rabbit hemorrhagic disease virus-molecular cloning and nucleotide sequencing of a calicivirus genome. *Virology*, 184: 664-676.

Meyers G, Wirblich C, Thiel HJ y Thumfart JO (2000). Rabbit hemorrhagic disease virus: genome organization and polyprotein processing of a calicivirus studied after transient expression of cDNA constructs. *Virology*, 276: 349-363.

Mikami O, Park JH, Kimura T, Ochiai K y Itakura C (1999). Hepatic lesions in young rabbits experimentally infected with rabbit haemorrhagic disease virus. *Res Vet Sci*, 66: 237-242.

Mikschofsky H, Schirrmeier H, Keil GM, Lange B, Polowick PL, Keller W y Broer I (2009). Pea-derived vaccines demonstrate high immunogenicity and protection in rabbits against rabbit haemorrhagic disease virus. *Plant Biotechnol J*, 7: 537-549.

Moreno N (2016). Cápsidas vacías del virus de la enfermedad hemorrágica del conejo como plataforma para la inducción de respuesta humoral neutralizante y protectora frente

a epítomos B heterólogos. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España.

Moreno N, Mena I, Angulo I, Gómez Y, Crisci E, Montoya M, Castón JR, Blanco E y Bárcena J (2016). Rabbit hemorrhagic disease virus capsid, a versatile platform for foreign B-cell epitope display inducing protective humoral immune responses. *Sci Rep*, 6: 31844.

Morrison CA, Colin T, Sexton JL, Bowen F, Wicker J, Friedel T y Spithill TW (1996). Protection of cattle against *Fasciola hepatica* infection by vaccination with glutathione S-transferase. *Vaccine*, 14: 1603-1612.

Moss SR, Turner SL, Trout RC, White PJ, Hudson PJ, Desai A, Armesto M, Forrester NL y Gould EA (2002). Molecular epidemiology of rabbit haemorrhagic disease virus. *J Gen Virol*, 83: 2461-2467.

Moussa A, Chasey D, Lavazza A, Capucci L, Šmid B, Meyers G, Rossi C, Thiel HJ, Vlášak R, Rønsholt L, Nowotny N, Mccullough K y Gavier-Widen D (1992). Haemorrhagic disease of lagomorphs: evidence for a calicivirus. *Vet Microbiol*, 33: 375-381.

Muller A, Freitas J, Silva E, Le Gall-Reculé G, Zwingelstein F, Abrantes J, Esteves PJ, Alves PC, Van Der LW, Kolodziejek J, Nowotny N y Thompson G (2009). Evolution of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) in the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) from the Iberian Peninsula. *Vet. Microbiol*, 135: 368-373.

Müller C, Ulrich R, Franzke K, Müller M y Köllner B (2019). Crude extracts of recombinant baculovirus expressing rabbit hemorrhagic disease virus 2 VLPs from both insect and rabbit cells protect rabbits from rabbit hemorrhagic disease caused by RHDV2. *Arch Virol*, 164: 137-148.

Nagesha HS, Mccoll KA, Collins BJ, Morrissy CJ, Wang LF y Westbury HA (2000). The presence of cross-reactive antibodies to rabbit haemorrhagic disease virus in Australian wild rabbits prior to the escape of virus from quarantine. *Arch Virol*, 145: 749-757.

Nagesha HS, Wang LF y Hyatt AD (1999). Virus-like particles of calicivirus as epitope carriers. *Arch Virol*, 144: 2429-2439.

Nagesha HS, Wang LF, Hyatt AD, Morrissy CJ, Lenghaus C y Westbury HA (1995). Self-assembly, antigenicity, and immunogenicity of the rabbit haemorrhagic disease virus (Czechoslovakian strain V-351) capsid protein expressed in baculovirus. *Arch Virol*, 140: 1095-1108.

Nelson PN, Reynolds GM, Waldron EE, Ward E, Giannopoulos K y Murray PG (2000). Demystified...Monoclonal antibodies. *Mol Pathol*, 53: 111-117.

Oggioni MR, Medaglini D, Maggi T y Pozzi G (1999). Engineering the gram-positive cell surface for construction of bacterial vaccine vectors. *Methods*, 19: 163-173.

Ohlinger VF, Haas B, Meyers G, Weiland F y Thiel HJ (1990). Identification and characterization of the virus causing rabbit hemorrhagic disease. *J Virol*, 64: 3331-3336.

Ohlinger VF y Thiel HJ (1991). Identification of the viral haemorrhagic disease virus of rabbits as a calicivirus. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, 10: 311-323.

OIE (2016). Terrestrial manual. Chapter 2.6.2: Rabbit haemorrhagic disease. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.06.02_RHD.pdf.

Oka T, Murakami K, Wakita T y Katayama K (2011). Comparative site-directed mutagenesis in the catalytic amino acid triad in calicivirus proteases. *Microbiol Immunol*, 55: 108-114.

Oliver SL, Asobayire E, Dastjerdi AM y Bridger JC (2006). Genomic characterization of the unclassified bovine enteric virus Newbury agent-1 (Newbury1) endorses a new genus in the family *Caliciviridae*. *Virology*, 350: 240-250.

Ossiboff RJ, Zhou Y, Lightfoot PJ, Prasad BV y Parker JS (2010). Conformational changes in the capsid of a calicivirus upon interaction with its functional receptor. *J Virol*, 84: 5550-5564.

Pant N, Hultberg A, Zhao Y, Svensson L, Pan-Hammarström Q, Johansen K, Pouwels PH, Ruggeri FM, Hermans P, Frenken L, Borén T, Marcotte H y Hammarström L (2006). Lactobacilli expressing variable domain of llama heavy-chain antibody fragments (lactobodies) confer protection against rotavirus-induced diarrhea. *J Infect Dis*, 194: 1580-1588.

Park J, Lee Y y Itakura C (1995). Pathogenesis of acute necrotic hepatitis in rabbit hemorrhagic disease. *Lab Anim Sci*, 45: 445-449.

Parra F y Prieto M (1990). Purification and characterization of a calicivirus as the causative agent of a lethal hemorrhagic disease in rabbits. *J Virol*, 64: 4013-4015.

Parry N, Fox G, Rowlands DJ, Brown F, Fry E, Acharya R, Logan D y Stuart D (1990). Structural and serological evidence for a novel mechanism of antigenic variation in foot-and-mouth disease virus. *Nature*, 347: 569-572.

Patton NM (1989). Viral hemorrhagic disease. A major new disease problem of rabbits. *Rabbit Res*, 12:64-67.

Peacey M, Wilson S, Baird MA y Ward VK (2007). Versatile RHDV virus-like particles: Incorporation of antigens by genetic modification and chemical conjugation. *Biotechnol Bioeng*, 98: 968-977.

Peacey M, Wilson S, Perret R, Ronchese F, Ward VK, Young V, Young SL y Baird MA (2008). Virus-like particles from rabbit hemorrhagic disease virus can induce an anti-tumor response. *Vaccine*, doi:10.1016/j.vaccine.2008.1007.1074.

Pérez-Filgueira DM, Resino-Talaván P, Cubillos C, Angulo I, Barderas MG, Barcena J y Escribano JM (2007). Development of a low-cost, insect larvae-derived recombinant subunit vaccine against RHDV. *Virology*, 364: 422-430.

Pérez-Martín E, Gómez-Sebastián S, Argilaguet JM, Sibila M, Fort M, Nofrarias M, Kurtz S, Escribano JM, Segales J y Rodríguez F (2010). Immunity conferred by

an experimental vaccine based on the recombinant PCV2 Cap protein expressed in *Trichoplusia ni*-larvae. *Vaccine*, 28: 2340-2349.

Pillai S, Dermody K y Metcalf B (1995). Immunogenicity of genetically engineered glutathione S-transferase fusion proteins containing a T-cell epitope from diphtheria toxin. *Infect Immun*, 63: 1535-1540.

Plana-Duran J, Bastons M, Rodriguez MJ, Climent I, Cortés E, Vela C y Casal I (1996). Oral immunization of rabbits with VP60 particles confers protection against rabbit hemorrhagic disease. *Arch Virol*, 141: 1423-1436.

Plotkin SA (2005). Vaccines: past, present and future. *Nat Med*, 11: 5-11.

Plummer EM y Manchester M (2011). Viral nanoparticles and virus-like particles: platforms for contemporary vaccine design. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 3: 174-196.

Prasad BVV, Hardy ME, Dokland T, Bella J, Rossmann MG y Estes MK (1999). X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science*, 286: 287-290.

Prieto JM, Fernandez E, Alvarez V, Espi A, Marin JFG, Alvarez M, Martin JM y Parra F (2000). Immunohistochemical localisation of rabbit haemorrhagic disease virus VP-60 antigen in early infection of young and adult rabbits. *Res Vet Sci*, 68: 181-187.

Puggioni G, Cavadini P, Maestrone C, Scivoli R, Botti G, Ligios C, Le Gall-Recule G, Lavazza A y Capucci L (2013). The new French 2010 Rabbit hemorrhagic Disease Virus causes an RHD-like disease in the Sardinian Cape hare (*Lepus capensis mediterraneus*). *Vet Res*, 44: 96.

Rai DK, Diaz-San Segundo F, Schafer E, Burrage TG, Rodriguez LL, De Los Santos T, Hoepflich PD y Rieder E (2016). Novel 6xHis tagged foot-and-mouth disease virus vaccine bound to nanolipoprotein adjuvant via metal ions provides antigenic distinction and effective protective immunity. *Virology*, 495: 136-147.

Ramiro-Ibáñez F, Martín-Alonso JM, García Palencia P, Parra F y Alonso C (1999). Macrophage tropism of rabbit hemorrhagic disease virus is associated with vascular pathology. *Virus Res*, 60: 21-28.

Read AJ y Kirkland PD (2017). Efficacy of a commercial vaccine against different strains of rabbit haemorrhagic disease virus. *Aust Vet J*, 95: 223-226.

Robinson AJ, So PTM, Müller WJ, Cooke BD y Capucci L (2002). Statistical models for the effect of age and maternal antibodies on the development of rabbit haemorrhagic disease in Australian wild rabbits. *Wildlife Res*, 29: 663-671.

Sanchez J, Dohoo IR, Markham F, Leslie K y Conboy G (2002). Evaluation of the repeatability of a crude adult indirect *Ostertagia ostertagi* ELISA and methods of expressing test results. *Vet Parasitol*, 109: 75-90.

Schirrmeier H, Reimann I, Kollner B y Granzow H (1999). Pathogenic, antigenic and molecular properties of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) isolated from

vaccinated rabbits: detection and characterization of antigenic variants. *Arch Virol*, 144: 719-735.

Sexton JL, Milner AR, Panaccio M, Waddington J, Wijffels G, Chandler D, Thompson C, Wilson L, Spithill TW, Mitchell GF y Et Al. (1990). Glutathione S-transferase. Novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *J Immunol*, 145: 3905-3910.

Shanker S, Czako R, Sankaran B, Atmar RL, Estes MK y Prasad BVV (2014). Structural analysis of determinants of histo-blood group antigen binding specificity in genogroup I noroviruses. *J Virol*, 88: 6168-6180.

Simpson V, Everest D y Westcott D (2014). RHDV variant 2 and *Capillaria hepatica* infection in rabbits. *Vet Rec*, 174: 486.

Smíd B, Valíček L, Rodák L, Stěpánek J y Jurák E (1991). Rabbit haemorrhagic disease: an investigation of some properties of the virus and evaluation of an inactivated vaccine. *Vet Microbiol*, 26: 77-85.

Smith TJ (2011). Structural studies on antibody recognition and neutralization of viruses. *Curr Opin Virol*, 1: 150-156.

Spibey N, McCabe VJ, Greenwood NM, Jack SC, Sutton D y Van Der Waart L (2012). Novel bivalent vectored vaccine for control of myxomatosis and rabbit haemorrhagic disease. *Vet Rec*, 170: 309.

Strive T, Wright JD y Robinson AJ (2009). Identification and partial characterisation of a new lagovirus in Australian wild rabbits. *Virology*, 384: 97-105.

Tan M, Hegde RS y Jiang X (2004a). The P domain of norovirus capsid protein forms dimer and binds to histo-blood group antigen receptors. *J Virol*, 78: 6233-6242.

Tan M, Zhong W, Song D, Thornton S y Jiang X (2004b). *E. coli*-expressed recombinant norovirus capsid proteins maintain authentic antigenicity and receptor binding capability. *J Med Virol*, 74: 641-649.

Taube S, Rubin JR, Katpally U, Smith TJ, Kendall A, Stuckey JA y Wobus CE (2010). High-resolution X-ray structure and functional analysis of the murine norovirus 1 capsid protein protruding domain. *J Virol*, 84: 5695-5705.

Team Core R (2018). R: A language and environment for statistical computing. Foundation for statistical computing.

Thiel HJ y König M (1999). Caliciviruses: an overview. *Vet Microbiol*, 69: 55-62.

Tohya Y, Yokoyama N, Maeda K, Kawaguchi Y y Mikami T (1997). Mapping of antigenic sites involved in neutralization on the capsid protein of feline calicivirus. *J Gen Virol*, 78: 303-305.

Torres JM, Ramírez MA, Morales M, Bárcena J, Vázquez B, Espuña E, Pagès-Manté A y Sánchez-Vizcaíno JM (2000). Safety evaluation of a recombinant myxoma-

RHDV virus inducing horizontal transmissible protection against myxomatosis and rabbit haemorrhagic disease. *Vaccine*, 19: 174-182.

Turner MS, Hafner LM, Walsh T y Giffard PM (2004). Identification and characterization of the novel LysM domain-containing surface protein Sep from *Lactobacillus fermentum* BR11 and its use as a peptide fusion partner in *Lactobacillus* and *Lactococcus*. *Appl Environ Microbiol*, 70: 3673-3680.

Urakova N, Frese M, Hall RN, Liu J, Matthaei M y Strive T (2015). Expression and partial characterisation of rabbit haemorrhagic disease virus non-structural proteins. *Virology*, 484: 69-79.

Valíček L, Smíd B, Rodák L y Kudrna J (1990). Electron and immunoelectron microscopy of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV). *Arch Virol*, 112: 271-275.

Ventura M, Jankovic I, Walker DC, Pridmore RD y Zink R (2002). Identification and characterization of novel surface proteins in *Lactobacillus johnsonii* and *Lactobacillus gasseri*. *Appl Environ Microbiol*, 68: 6172-6181.

Viaplana E, Plana J y Villaverde A (1997). Antigenicity of VP60 structural protein of rabbit haemorrhagic disease virus. *Arch Virol*, 142: 1843-1848.

Vieira J y Messing J (1991). New pUC-derived cloning vectors with different selectable markers and DNA replication origins. *Gene*, 100: 189-194.

Villafuerte R, Calvete C, Blanco JC y Lucientes J (1995). Incidence of viral hemorrhagic disease in wild rabbit populations in Spain. *Mammalia*, 59: 651-659.

Wang X, Xu F, Liu J, Gao B, Liu Y, Zhai Y, Ma J, Zhang K, Baker TS, Schulten K, Zheng D, Pang H y Sun F (2013). Atomic model of rabbit hemorrhagic disease virus by cryo-electron microscopy and crystallography. *PLoS Pathog*, 9: e1003132.

Wells JM y Mercenier A (2008). Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. *Nat Rev Microbiol*, 6: 349-362.

Westcott DG, Frossard JP, Everest D, Dastjerdi A, Duff JP, Steinbach F y Choudhury B (2014). Incursion of RHDV2-like variant in Great Britain. *Vet Rec*, 174: 333.

White PJ, Trout RC, Moss SR, Desai A, Armesto M, Forrester NL, Gould EA y Hudson PJ (2004). Epidemiology of rabbit haemorrhagic disease virus in the United Kingdom: evidence for seasonal transmission by both virulent and avirulent modes of infection. *Epidemiol Infect*, 132: 555-567.

Wirblich C, Meyers G, Ohlinger VF, Capucci L, Eskens U, Haas B y Thiel HJ (1994). European brown hare syndrome virus: relationship to rabbit hemorrhagic disease virus and other caliciviruses. *J Virol*, 68: 5164-5173.

Wirblich C, Sibilía M, Boniotti MB, Rossi C, Thiel HJ y Meyers G (1995). 3C-like protease of rabbit hemorrhagic disease virus: identification of cleavage sites in the ORF1 polyprotein and analysis of cleavage specificity. *J Virol*, 69: 7159-7168.

Wirblich C, Thiel HJ y Meyers G (1996). Genetic map of the calicivirus rabbit hemorrhagic disease virus as deduced from in vitro translation studies. *J Virol*, 70: 7974-7983.

Xu ZJ y Chen WX (1989). Viral haemorrhagic disease in rabbits: a review. *Vet Res Commun*, 13: 205-212.

Yokoyama M, Oka T, Takagi H, Kojima H, Okabe T, Nagano T, Tohya Y y Sato H (2017). A proposal for a structural model of the feline calicivirus protease bound to the substrate peptide under physiological conditions. *Front Microbiol*, 8: 1383.

Zhao Y, Chapman DA y Jones IM (2003). Improving baculovirus recombination. *Nucleic Acids Res*, 31: e6.

Anexo

8. ANEXO

8.1. TABLA SUPLEMENTARIA

Tabla S1. Hibridomas obtenidos tras la inmunización de ratones con VLPs de distintos RHDV.

Hibridomas obtenidos con VLPs de RHDV-Nav10-11					Hibridomas obtenidos con VLPs de RHDV-Gal09/12				
Subclonaciones		Reactividad frente a VLPs			Subclonaciones		Reactividad frente a VLPs		
1 ^a	2 ^a	RHDVG1	RHDVa	RHDVb	1 ^a	2 ^a	RHDVG1	RHDVa	RHDVb
2A11.12		n-e	n-e	n-e	7	7.1	-	+	-/+
2A11					7	7.2	-	+	-/+
2A11.14		n-e	n-e	n-e		7.5	-	+	-/+
2D9.1		-	-	+	11				
2D9	2D9.2	2D9.23	-	-					
	2D9.3		-	-	12				
3A10.1	3A10.14	+	+	+	30	30.9 ^R	-	-	-
						30.14 ^R	-	-	-
3A10	3A10.2	+	+	+		51.4 ^R	-	-	-
	3A10.3	+	+	+	51	51.5 ^R	-	-	-
6B9.6		n-e	n-e	n-e	78*		+	+	-
6B9						82.2	82.28	+	+
	6B9.8	n-e	n-e	n-e	82	82.3	+	+	-
8E10*		+	+	+	105	105.3	-	-/+	-
						105.8	-	-/+	-
					125	125.6	-/+	-/+	-/+
						125.8	-/+	-/+	-/+

Sombreados en gris aparecen los hibridomas finales a partir de los que se purificaron los anticuerpos correspondientes. *No se obtuvieron subclones estables. ^R Se pierde la reactividad frente a las VLPs. Reacción frente a VLPs: positiva (+), negativa (-), muy débil (+/-) o no específica (n-e).

8.2. FIGURAS SUPLEMENTARIAS

	GGATCCAGCAAAAACCGTTGATAGCATTAGTCTCTGCCGATCTGCTGACCAAC	Majority
	10 20 30 40 50	
1	GGATCCAGCAAAAACCGTTGATAGCATTAGTCTCTGCCGATCTGCTGACCAAC	Pdom N11
1	GGATCCAGCAAAAACCGTTGATAGCATTAGTCTCTGCCGATCTGCTGACCAAC	L1Ast89
1	GGATCCAGCAAAAACCGTTGATAGCATTAGTCTCTGCCGATCTGCTGACCAAC	L2Ast89
1	GGATCCAGCAAAAACCGTTGATAGCATTAGTCTCTGCCGATCTGCTGACCAAC	L3Ast89
1	GGATCCAGCAAAAACCGTTGATAGCATTAGTCTCTGCCGATCTGCTGACCAAC	L4Ast89
1	GGATCCAGCAAAAACCGTTGATAGCATTAGTCTCTGCCGATCTGCTGACCAAC	L5Ast89
1	GGATCCAGCAAAAACCGTTGATAGCATTAGTCTCTGCCGATCTGCTGACCAAC	L1L4Ast89
1	GGATCCAGCAAAAACCGTTGATAGCATTAGTCTCTGCCGATCTGCTGACCAAC	L4L5Ast89
1	GGATCCAGCAAAAACCGTTGATAGCATTAGTCTCTGCCGATCTGCTGACCAAC	L1L4L5Ast89
1	GGATCCAGCAAAAACCGTTGATAGCATTAGTCTCTGCCGATCTGCTGACCAAC	Pdom Ast89
	ACCGGTTCTGACCCGGTGTGGCACCCGATAAATCGTTGGAAATGGTGA AATTG	Majority
	60 70 80 90 100	
51	ACCGGTTCTGACCCGGTGTGGCACCCGATAAATCGTTGGAAATGGTGA AATTG	Pdom N11
51	ACCGGTTCTGACCCGGTGTGGCACCCGATAAATCGTTGGAAATGGTGA AATTG	L1Ast89
51	ACCGGTTCTGACCCGGTGTGGCACCCGATAAATCGTTGGAAATGGTGA AATTG	L2Ast89
51	ACCGGTTCTGACCCGGTGTGGCACCCGATAAATCGTTGGAAATGGTGA AATTG	L3Ast89
51	ACCGGTTCTGACCCGGTGTGGCACCCGATAAATCGTTGGAAATGGTGA AATTG	L4Ast89
51	ACCGGTTCTGACCCGGTGTGGCACCCGATAAATCGTTGGAAATGGTGA AATTG	L5Ast89
51	ACCGGTTCTGACCCGGTGTGGCACCCGATAAATCGTTGGAAATGGTGA AATTG	L1L4Ast89
51	ACCGGTTCTGACCCGGTGTGGCACCCGATAAATCGTTGGAAATGGTGA AATTG	L4L5Ast89
51	ACCGGTTCTGACCCGGTGTGGCACCCGATAAATCGTTGGAAATGGTGA AATTG	L1L4L5Ast89
51	ACCGGTTCTGACCCGGTGTGGTAAATGATAAATCGTTGGAAATGGTCAAGATTG	Pdom Ast89
	TTGGTCTGACAGCCGGTTCGGGGTGGTTTTAGCACCTGTAATCGTCAATTGG	Majority
	110 120 130 140 150	
101	TTGGTCTGACAGCCGGTTCGGGGTGGTTTTAGCACCTGTAATCGTCAATTGG	Pdom N11
101	TTGGTCTGACAGCCGGTTCGGGGTGGTTTTAGCACCTGTAATCGTCAATTGG	L1Ast89
101	TTGGTCTGACAGCCGGTTCGGGGTGGTTTTAGCACCTGTAATCGTCAATTGG	L2Ast89
101	TTGGTCTGACAGCCGGTTCGGGGTGGTTTTAGCACCTGTAATCGTCAATTGG	L3Ast89
101	TTGGTCTGACAGCCGGTTCGGGGTGGTTTTAGCACCTGTAATCGTCAATTGG	L4Ast89
101	TTGGTCTGACAGCCGGTTCGGGGTGGTTTTAGCACCTGTAATCGTCAATTGG	L5Ast89
101	TTGGTCTGACAGCCGGTTCGGGGTGGTTTTAGCACCTGTAATCGTCAATTGG	L1L4Ast89
101	TTGGTCTGACAGCCGGTTCGGGGTGGTTTTAGCACCTGTAATCGTCAATTGG	L4L5Ast89
101	TTGGTCTGACAGCCGGTTCGGGGTGGTTTTAGCACCTGTAATCGTCAATTGG	L1L4L5Ast89
101	TTGGTCTGACAGCCGGTTCGGGGTGGTTTTAGCACCTGTAATCGTCAATTGG	Pdom Ast89
	AATCTGAAATGGTAGCACCTTTGGTTGGAGCAGTCCGCGTTTTTGACAGCAAT	Majority
	160 170 180 190 200	
151	AATCTGAAATGGTAGCACCTTTGGTTGGAGCAGTCCGCGTTTTTGACAGCAAT	Pdom N11
151	AATCTGAAATGGTAGCACCTTTGGTTGGAGCAGTCCGCGTTTTTGACAGCAAT	L1Ast89
151	AATCTGAAATGGTAGCACCTTTGGTTGGAGCAGTCCGCGTTTTTGACAGCAAT	L2Ast89
151	AATCTGAAATGGTAGCACCTTTGGTTGGAGCAGTCCGCGTTTTTGACAGCAAT	L3Ast89
151	AATCTGAAATGGTAGCACCTTTGGTTGGAGCAGTCCGCGTTTTTGACAGCAAT	L4Ast89
151	AATCTGAAATGGTAGCACCTTTGGTTGGAGCAGTCCGCGTTTTTGACAGCAAT	L5Ast89
151	AATCTGAAATGGTAGCACCTTTGGTTGGAGCAGTCCGCGTTTTTGACAGCAAT	L1L4Ast89
151	AATCTGAAATGGTAGCACCTTTGGTTGGAGCAGTCCGCGTTTTTGACAGCAAT	L4L5Ast89
151	AATCTGAAATGGTAGCACCTTTGGTTGGAGCAGTCCGCGTTTTTGACAGCAAT	L1L4L5Ast89
151	AATCTGAAATGGTAGCACCTAATGGTTGGAGCAGTCCGCGTTTTTGACAGCAAT	Pdom Ast89
	TGATCATGACCGTGGTAAATGCAAGCTATCCGGGTAGCAGCAGCAGTAATG	Majority
	210 220 230 240 250	
201	TGATCATGACCGTGGTAAATGCAAGCTATCCGGGTAGCAGCAGCAGTAATG	Pdom N11
201	TGATCATGACCGTGGTAAATGCAAGCTATCCGGGTAGCAGCAGCAGTAATG	L1Ast89
201	TGATCATGACCGTGGTAAATGCAAGCTATCCGGGTAGCAGCAGCAGTAATG	L2Ast89
201	TGATCATGACCGTGGTAAATGCAAGCTATCCGGGTAGCAGCAGCAGTAATG	L3Ast89
201	TGATCATGACCGTGGTAAATGCAAGCTATCCGGGTAGCAGCAGCAGTAATG	L4Ast89
201	TGATCATGACCGTGGTAAATGCAAGCTATCCGGGTAGCAGCAGCAGTAATG	L5Ast89
201	TGATCATGACCGTGGTAAATGCAAGCTATCCGGGTAGCAGCAGCAGTAATG	L1L4Ast89
201	TGATCATGACCGTGGTAAATGCAAGCTATCCGGGTAGCAGCAGCAGTAATG	L4L5Ast89
201	TGATCATGACCGTGGTAAATGCAAGCTATCCGGGTAGCAGCAGCAGTAATG	L1L4L5Ast89
201	TGATCATGACCGTGGTAAATGCAAGCTATCCGGGTAGCAGCAGCAGTAATG	Pdom Ast89

	TTCTGGAAGTGTGGTATGCCAGCGCAGGTAGCGCAGCCGATAATCCGATT					Majority
	Lazo 1			Lazo 2		
	260		270	280	290	300
251	TTCTGGAAGTGTGGTATGCCAGCGCAGGTAGCGCAGCCGATAATCCGATT					Pdom N11
251	TTCTGGAAGTGTGGTATGCCAGCGCAGGTAGCGCAGCCGATAATCCGATT					L1Ast89
251	TTCTGGAAGTGTGGTATGCCAGCGCAGGTAGCGCAGCCGATAATCCGATT					L2Ast89
251	TTCTGGAAGTGTGGTATGCCAGCGCAGGTAGCGCAGCCGATAATCCGATT					L3Ast89
251	TTCTGGAAGTGTGGTATGCCAGCGCAGGTAGCGCAGCCGATAATCCGATT					L4Ast89
251	TTCTGGAAGTGTGGTATGCCAGCGCAGGTAGCGCAGCCGATAATCCGATT					L5Ast89
251	TTCTGGAAGTGTGGTATGCCAGCGCAGGTAGCGCAGCCGATAATCCGATT					L1L4Ast89
251	TTCTGGAAGTGTGGTATGCCAGCGCAGGTAGCGCAGCCGATAATCCGATT					L4L5Ast89
251	TTCTGGAAGTGTGGTATGCCAGCGCAGGTAGCGCAGCCGATAATCCGATT					L1L4L5Ast89
251	TTCTGGAAGTGTGGTATGCCAGCGCAGGTAGCGCAGCCGATAATCCGATT					Pdom Ast89
	AGCCAGATTGCACCCGGATGGTTTTTCCGGATATGAGCTTTGTTCCGTTTAG					Majority
			Lazo 2			
	310		320	330	340	350
301	AGCCAGATTGCACCCGGATGGTTTTTCCGGATATGAGCTTTGTTCCGTTTAG					Pdom N11
301	AGCCAGATTGCACCCGGATGGTTTTTCCGGATATGAGCTTTGTTCCGTTTAG					L1Ast89
301	AGCCAGATTGCACCCGGATGGTTTTTCCGGATATGAGCTTTGTTCCGTTTAG					L2Ast89
301	AGCCAGATTGCACCCGGATGGTTTTTCCGGATATGAGCTTTGTTCCGTTTAG					L3Ast89
301	AGCCAGATTGCACCCGGATGGTTTTTCCGGATATGAGCTTTGTTCCGTTTAG					L4Ast89
301	AGCCAGATTGCACCCGGATGGTTTTTCCGGATATGAGCTTTGTTCCGTTTAG					L5Ast89
301	AGCCAGATTGCACCCGGATGGTTTTTCCGGATATGAGCTTTGTTCCGTTTAG					L1L4Ast89
301	AGCCAGATTGCACCCGGATGGTTTTTCCGGATATGAGCTTTGTTCCGTTTAG					L4L5Ast89
301	AGCCAGATTGCACCCGGATGGTTTTTCCGGATATGAGCTTTGTTCCGTTTAG					L1L4L5Ast89
301	AGCCAGATTGCACCCGGATGGTTTTTCCGGATATGAGCTTTGTTCCGTTTAG					Pdom Ast89
	CGGCACCACCGTTCCGACCCGCAAGGTTGGGTTGGTTTTGGTGGTATTTGGAA					Majority
			Lazo 2		Lazo 3	
	360		370	380	390	400
351	CGGCACCACCGTTCCGACCCGCAAGGTTGGGTTGGTTTTGGTGGTATTTGGAA					Pdom N11
351	CGGCACCACCGTTCCGACCCGCAAGGTTGGGTTGGTTTTGGTGGTATTTGGAA					L1Ast89
351	CGGCACCACCGTTCCGACCCGCAAGGTTGGGTTGGTTTTGGTGGTATTTGGAA					L2Ast89
351	CGGCACCACCGTTCCGACCCGCAAGGTTGGGTTGGTTTTGGTGGTATTTGGAA					L3Ast89
351	CGGCACCACCGTTCCGACCCGCAAGGTTGGGTTGGTTTTGGTGGTATTTGGAA					L4Ast89
351	CGGCACCACCGTTCCGACCCGCAAGGTTGGGTTGGTTTTGGTGGTATTTGGAA					L5Ast89
351	CGGCACCACCGTTCCGACCCGCAAGGTTGGGTTGGTTTTGGTGGTATTTGGAA					L1L4Ast89
351	CGGCACCACCGTTCCGACCCGCAAGGTTGGGTTGGTTTTGGTGGTATTTGGAA					L4L5Ast89
351	CGGCACCACCGTTCCGACCCGCAAGGTTGGGTTGGTTTTGGTGGTATTTGGAA					L1L4L5Ast89
351	CGGCACCACCGTTCCGACCCGCAAGGTTGGGTTGGTTTTGGTGGTATTTGGAA					Pdom Ast89
	ATAGCAGCAATGGTGCACCGTTTGTACCACCGTGCAGGCATATGAAGT					Majority
			Lazo 3			
	410		420	430	440	450
401	ATAGCAGCAATGGTGCACCGTTTGTACCACCGTGCAGGCATATGAAGT					Pdom N11
401	ATAGCAGCAATGGTGCACCGTTTGTACCACCGTGCAGGCATATGAAGT					L1Ast89
401	ATAGCAGCAATGGTGCACCGTTTGTACCACCGTGCAGGCATATGAAGT					L2Ast89
401	ATAGCAGCAATGGTGCACCGTTTGTACCACCGTGCAGGCATATGAAGT					L3Ast89
401	ATAGCAGCAATGGTGCACCGTTTGTACCACCGTGCAGGCATATGAAGT					L4Ast89
401	ATAGCAGCAATGGTGCACCGTTTGTACCACCGTGCAGGCATATGAAGT					L5Ast89
401	ATAGCAGCAATGGTGCACCGTTTGTACCACCGTGCAGGCATATGAAGT					L1L4Ast89
401	ATAGCAGCAATGGTGCACCGTTTGTACCACCGTGCAGGCATATGAAGT					L4L5Ast89
401	ATAGCAGCAATGGTGCACCGTTTGTACCACCGTGCAGGCATATGAAGT					L1L4L5Ast89
401	ATAGCAGCAATGGTGCACCGTTTGTACCACCGTGCAGGCATATGAAGT					Pdom Ast89
	GGTTTTGCAACAGGTGCACCGGCAATCTGCAGCCGACCACCACCACCTC					Majority
			Lazo 4			
	460		470	480	490	500
451	GGTTTTGCAACAGGTGCACCGGCAATCTGCAGCCGACCACCACCACCTC					Pdom N11
451	GGTTTTGCAACAGGTGCACCGGCAATCTGCAGCCGACCACCACCACCTC					L1Ast89
451	GGTTTTGCAACAGGTGCACCGGCAATCTGCAGCCGACCACCACCACCTC					L2Ast89
451	GGTTTTGCAACAGGTGCACCGGCAATCTGCAGCCGACCACCACCACCTC					L3Ast89
451	GGTTTTGCAACAGGTGCACCGGCAATCTGCAGCCGACCACCACCACCTC					L4Ast89
451	GGTTTTGCAACAGGTGCACCGGCAATCTGCAGCCGACCACCACCACCTC					L5Ast89
451	GGTTTTGCAACAGGTGCACCGGCAATCTGCAGCCGACCACCACCACCTC					L1L4Ast89
451	GGTTTTGCAACAGGTGCACCGGCAATCTGCAGCCGACCACCACCACCTC					L4L5Ast89
451	GGTTTTGCAACAGGTGCACCGGCAATCTGCAGCCGACCACCACCACCTC					L1L4L5Ast89
451	GGTTTTGCAACAGGTGCACCGGCAATCTGCAGCCGACCACCACCACCTC					Pdom Ast89

		Majority					
		510	520	530	Lazo 5	540	550
		AGGTGCACAGATTGTTGCCAAAAGCATTATATGGTGTGGCCACCGGTATTA					
501	Pdom N11	AGGTGCACAGATTGTTGCCAAAAGCATTATATGGTGTGGCCACCGGTATTA					
501	L1Ast89	AGGTGCACAGATTGTTGCCAAAAGCATTATATGGTGTGGCCACCGGTATTA					
501	L2Ast89	AGGTGCACAGATTGTTGCCAAAAGCATTATATGGTGTGGCCACCGGTATTA					
501	L3Ast89	AGGTGCACAGATTGTTGCCAAAAGCATTATATGGTGTGGCCACCGGTATTA					
501	L4Ast89	AGGTGCACAGATTGTTGCCAAAAGCATTATATGGTGTGGCCACCGGTATTA					
501	L5Ast89	AGGTGCACAGATTGTTGCCAAAAGCATTATATGCTGTGTGTCACCGGTACTG					
501	L1L4Ast89	AGGTGCACAGATTGTTGCCAAAAGCATTATATGGTGTGGCCACCGGTATTA					
501	L4L5Ast89	AGGTGCACAGATTGTTGCCAAAAGCATTATATGCTGTGTGTCACCGGTACTG					
501	L1L4L5Ast89	AGGTGCACAGATTGTTGCCAAAAGCATTATATGCTGTGTGTCACCGGTACTG					
501	Pdom Ast89	GGGTAGCCAGACCAGTGTGCAAAAAGCATTATATGCAAGTTGTTACCGGCACCCG					

		Majority				
		560	570	580	590	600
		ATCAGGCAACCGCAAGTCTGTTTGTATATGGCAAGCGGTGTTATTAGCACCC				
		Lazo 5				
551	Pdom N11	ATCAGGCAACCGCAAGTCTGTTTGTATATGGCAAGCGGTGTTATTAGCACCC				
551	L1Ast89	ATCAGGCAACCGCAAGTCTGTTTGTATATGGCAAGCGGTGTTATTAGCACCC				
551	L2Ast89	ATCAGGCAACCGCAAGTCTGTTTGTATATGGCAAGCGGTGTTATTAGCACCC				
551	L3Ast89	ATCAGGCAACCGCAAGTCTGTTTGTATATGGCAAGCGGTGTTATTAGCACCC				
551	L4Ast89	ATCAGGCAACCGCAAGTCTGTTTGTATATGGCAAGCGGTGTTATTAGCACCC				
551	L5Ast89	CTCAGAAATCCCGCAAGTCTGTTTGTATATGGCAAGCGGTGTTATTAGCACCC				
551	L1L4Ast89	ATCAGGCAACCGCAAGTCTGTTTGTATATGGCAAGCGGTGTTATTAGCACCC				
551	L4L5Ast89	CTCAGAAATCCCGCAAGTCTGTTTGTATATGGCAAGCGGTGTTATTAGCACCC				
551	L1L4L5Ast89	CTCAGAAATCCCGCAAGTCTGTTTGTATATGGCAAGCGGTGTTATTAGCACCC				
551	Pdom Ast89	CACAGAAATCCCGCAAGTCTGTTTGTATATGGCAAGCGGTGTTATTAGCACCC				

		Majority				
		610	620	630	640	650
		CCGAATAGCAGTGCAATTACCTATACCCCTCAGCCGAATCGTATTGTTAA				
601	Pdom N11	CCGAATAGCAGTGCAATTACCTATACCCCTCAGCCGAATCGTATTGTTAA				
601	L1Ast89	CCGAATAGCAGTGCAATTACCTATACCCCTCAGCCGAATCGTATTGTTAA				
601	L2Ast89	CCGAATAGCAGTGCAATTACCTATACCCCTCAGCCGAATCGTATTGTTAA				
601	L3Ast89	CCGAATAGCAGTGCAATTACCTATACCCCTCAGCCGAATCGTATTGTTAA				
601	L4Ast89	CCGAATAGCAGTGCAATTACCTATACCCCTCAGCCGAATCGTATTGTTAA				
601	L5Ast89	CCGAATAGCAGTGCAATTACCTATACCCCTCAGCCGAATCGTATTGTTAA				
601	L1L4Ast89	CCGAATAGCAGTGCAATTACCTATACCCCTCAGCCGAATCGTATTGTTAA				
601	L4L5Ast89	CCGAATAGCAGTGCAATTACCTATACCCCTCAGCCGAATCGTATTGTTAA				
601	L1L4L5Ast89	CCGAATAGCAGTGCAATTACCTATACCCCTCAGCCGAATCGTATTGTTAA				
601	Pdom Ast89	CCGAAGCCGCAATGCAATTACCTATACCCCTCAGCCGAATCGTATTGTTAA				

		Majority				
		660	670	680	690	700
		TGCACCGGGTACACCGGCAGCAGCACCGATTGGTAAAAATACCCCGATTA				
651	Pdom N11	TGCACCGGGTACACCGGCAGCAGCACCGATTGGTAAAAATACCCCGATTA				
651	L1Ast89	TGCACCGGGTACACCGGCAGCAGCACCGATTGGTAAAAATACCCCGATTA				
651	L2Ast89	TGCACCGGGTACACCGGCAGCAGCACCGATTGGTAAAAATACCCCGATTA				
651	L3Ast89	TGCACCGGGTACACCGGCAGCAGCACCGATTGGTAAAAATACCCCGATTA				
651	L4Ast89	TGCACCGGGTACACCGGCAGCAGCACCGATTGGTAAAAATACCCCGATTA				
651	L5Ast89	TGCACCGGGTACACCGGCAGCAGCACCGATTGGTAAAAATACCCCGATTA				
651	L1L4Ast89	TGCACCGGGTACACCGGCAGCAGCACCGATTGGTAAAAATACCCCGATTA				
651	L4L5Ast89	TGCACCGGGTACACCGGCAGCAGCACCGATTGGTAAAAATACCCCGATTA				
651	L1L4L5Ast89	TGCACCGGGTACACCGGCAGCAGCACCGATTGGTAAAAATACCCCGATTA				
651	Pdom Ast89	AAACACCGGGTACACCGGCAGCAGCACCGATTGGTAAAAATACCCCGATTA				

		Majority				
		710	720	730	740	750
		TGTTTGCAAGCGTTGTTTCGTCGTACCGGTGATATTAATGCCGAAGCAGGT				
701	Pdom N11	TGTTTGCAAGCGTTGTTTCGTCGTACCGGTGATATTAATGCCGAAGCAGGT				
701	L1Ast89	TGTTTGCAAGCGTTGTTTCGTCGTACCGGTGATATTAATGCCGAAGCAGGT				
701	L2Ast89	TGTTTGCAAGCGTTGTTTCGTCGTACCGGTGATATTAATGCCGAAGCAGGT				
701	L3Ast89	TGTTTGCAAGCGTTGTTTCGTCGTACCGGTGATATTAATGCCGAAGCAGGT				
701	L4Ast89	TGTTTGCAAGCGTTGTTTCGTCGTACCGGTGATATTAATGCCGAAGCAGGT				
701	L5Ast89	TGTTTGCAAGCGTTGTTTCGTCGTACCGGTGATATTAATGCCGAAGCAGGT				
701	L1L4Ast89	TGTTTGCAAGCGTTGTTTCGTCGTACCGGTGATATTAATGCCGAAGCAGGT				
701	L4L5Ast89	TGTTTGCAAGCGTTGTTTCGTCGTACCGGTGATATTAATGCCGAAGCAGGT				
701	L1L4L5Ast89	TGTTTGCAAGCGTTGTTTCGTCGTACCGGTGATATTAATGCCGAAGCAGGT				
701	Pdom Ast89	TGTTTGCAAGCGTTGTTTCGTCGTACCGGTGATATTAATGCCAACCAGCAGGT				

```

AGCACCAATGGCACCCAGTATGGTGCCGGTAGCCAGCCGCTGCCGGTTAC Majority
      760          770          780          790          800
751 AGCACCAATGGCACCCAGTATGGTGCCGGTAGCCAGCCGCTGCCGGTTAC Pdom N11
751 AGCACCAATGGCACCCAGTATGGTGCCGGTAGCCAGCCGCTGCCGGTTAC L1Ast89
751 AGCACCAATGGCACCCAGTATGGTGCCGGTAGCCAGCCGCTGCCGGTTAC L2Ast89
751 AGCACCAATGGCACCCAGTATGGTGCCGGTAGCCAGCCGCTGCCGGTTAC L3Ast89
751 AGCACCAATGGCACCCAGTATGGTGCCGGTAGCCAGCCGCTGCCGGTTAC L4Ast89
751 AGCACCAATGGCACCCAGTATGGTGCCGGTAGCCAGCCGCTGCCGGTTAC L5Ast89
751 AGCACCAATGGCACCCAGTATGGTGCCGGTAGCCAGCCGCTGCCGGTTAC L1L4Ast89
751 AGCACCAATGGCACCCAGTATGGTGCCGGTAGCCAGCCGCTGCCGGTTAC L4L5Ast89
751 AGCACCAATGGCACCCAGTATGGTGCCGGTAGCCAGCCGCTGCCGGTTAC L1L4L5Ast89
751 AGTGC A AATGGCACCCAGTATGGT A C A GGTAGCCAGCCGCTGCCGGTTAC Pdom Ast89

AGTGGGTCTGAGCCTGAATAACTATAGCAGCGCACTGATGCCCTGGTTCAGT Majority
      810          820          830          840          850
801 AGTGGGTCTGAGCCTGAATAACTATAGCAGCGCACTGATGCCCTGGTTCAGT Pdom N11
801 AGTGGGTCTGAGCCTGAATAACTATAGCAGCGCACTGATGCCCTGGTTCAGT L1Ast89
801 AGTGGGTCTGAGCCTGAATAACTATAGCAGCGCACTGATGCCCTGGTTCAGT L2Ast89
801 AGTGGGTCTGAGCCTGAATAACTATAGCAGCGCACTGATGCCCTGGTTCAGT L3Ast89
801 AGTGGGTCTGAGCCTGAATAACTATAGCAGCGCACTGATGCCCTGGTTCAGT L4Ast89
801 AGTGGGTCTGAGCCTGAATAACTATAGCAGCGCACTGATGCCCTGGTTCAGT L5Ast89
801 AGTGGGTCTGAGCCTGAATAACTATAGCAGCGCACTGATGCCCTGGTTCAGT L1L4Ast89
801 AGTGGGTCTGAGCCTGAATAACTATAGCAGCGCACTGATGCCCTGGTTCAGT L4L5Ast89
801 AGTGGGTCTGAGCCTGAATAACTATAGCAGCGCACTGATGCCCTGGTTCAGT L1L4L5Ast89
801 C A T TGGTCTGAGCCTGAATAACTATAGCAGCGCACTGATGCCCTGGTTCAGT Pdom Ast89

TTTTTGT TTTGGCAGCTGAATTTTGGCCAGCGGTTTTATGGAACTGGGTTCTG Majority
      860          870          880          890          900
851 TTTTGT TTTGGCAGCTGAATTTTGGCCAGCGGTTTTATGGAACTGGGTTCTG Pdom N11
851 TTTTGT TTTGGCAGCTGAATTTTGGCCAGCGGTTTTATGGAACTGGGTTCTG L1Ast89
851 TTTTGT TTTGGCAGCTGAATTTTGGCCAGCGGTTTTATGGAACTGGGTTCTG L2Ast89
851 TTTTGT TTTGGCAGCTGAATTTTGGCCAGCGGTTTTATGGAACTGGGTTCTG L3Ast89
851 TTTTGT TTTGGCAGCTGAATTTTGGCCAGCGGTTTTATGGAACTGGGTTCTG L4Ast89
851 TTTTGT TTTGGCAGCTGAATTTTGGCCAGCGGTTTTATGGAACTGGGTTCTG L5Ast89
851 TTTTGT TTTGGCAGCTGAATTTTGGCCAGCGGTTTTATGGAACTGGGTTCTG L1L4Ast89
851 TTTTGT TTTGGCAGCTGAATTTTGGCCAGCGGTTTTATGGAACTGGGTTCTG L4L5Ast89
851 TTTTGT TTTGGCAGCTGAATTTTGGCCAGCGGTTTTATGGAACTGGGTTCTG L1L4L5Ast89
851 TTTTGT TTTGGCAGCTGA C C TTTTGGCCAGCGGTTTTATGGAA A T TGGTCTG Pdom Ast89

TCAGTTGATGGTTATTTCTATGCAAGGTACAGGTGCAAGCGCAACCCTGAT Majority
      910          920          930          940          950
901 TCAGTTGATGGTTATTTCTATGCAAGGTACAGGTGCAAGCGCAACCCTGAT Pdom N11
901 TCAGTTGATGGTTATTTCTATGCAAGGTACAGGTGCAAGCGCAACCCTGAT L1Ast89
901 TCAGTTGATGGTTATTTCTATGCAAGGTACAGGTGCAAGCGCAACCCTGAT L2Ast89
901 TCAGTTGATGGTTATTTCTATGCAAGGTACAGGTGCAAGCGCAACCCTGAT L3Ast89
901 TCAGTTGATGGTTATTTCTATGCAAGGTACAGGTGCAAGCGCAACCCTGAT L4Ast89
901 TCAGTTGATGGTTATTTCTATGCAAGGTACAGGTGCAAGCGCAACCCTGAT L5Ast89
901 TCAGTTGATGGTTATTTCTATGCAAGGTACAGGTGCAAGCGCAACCCTGAT L1L4Ast89
901 TCAGTTGATGGTTATTTCTATGCAAGGTACAGGTGCAAGCGCAACCCTGAT L4L5Ast89
901 TCAGTTGATGGTTATTTCTATGCAAGGTACAGGTGCAAGCGCAACCCTGAT L1L4L5Ast89
901 TCAGTTGATGG T A TTTCTATGCAAGGTACAGGTGCAAGC A C AACCCTGAT Pdom Ast89

TGATCTGAGCGAACTGGTTGATATTCGTCCGGTTGGTCCGCGTCCGAGCA Majority
      960          970          980          990          1000
951 TGATCTGAGCGAACTGGTTGATATTCGTCCGGTTGGTCCGCGTCCGAGCA Pdom N11
951 TGATCTGAGCGAACTGGTTGATATTCGTCCGGTTGGTCCGCGTCCGAGCA L1Ast89
951 TGATCTGAGCGAACTGGTTGATATTCGTCCGGTTGGTCCGCGTCCGAGCA L2Ast89
951 TGATCTGAGCGAACTGGTTGATATTCGTCCGGTTGGTCCGCGTCCGAGCA L3Ast89
951 TGATCTGAGCGAACTGGTTGATATTCGTCCGGTTGGTCCGCGTCCGAGCA L4Ast89
951 TGATCTGAGCGAACTGGTTGATATTCGTCCGGTTGGTCCGCGTCCGAGCA L5Ast89
951 TGATCTGAGCGAACTGGTTGATATTCGTCCGGTTGGTCCGCGTCCGAGCA L1L4Ast89
951 TGATCTGAGCGAACTGGTTGATATTCGTCCGGTTGGTCCGCGTCCGAGCA L4L5Ast89
951 TGATCTGAGCGAACTGGTTGATATTCGTCCGGTTGGTCCGCGTCCGAGCA L1L4L5Ast89
951 TGATCTG A C G A A C T G A T T G A T G T T C G T C C G G T T G G T C C G C G T C C G A G C A Pdom Ast89

```

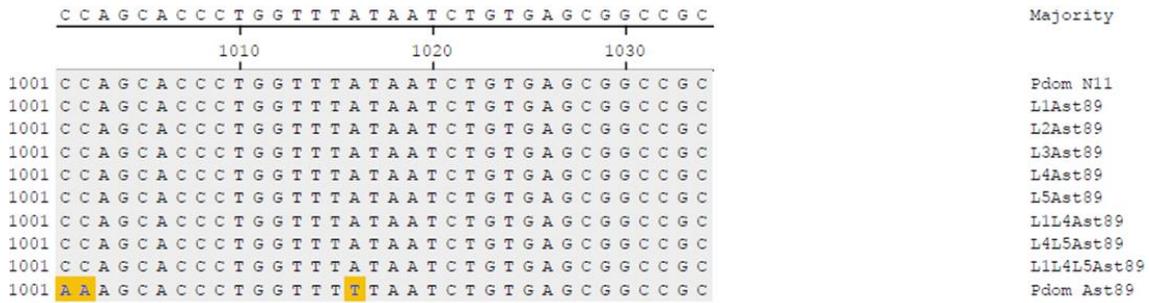
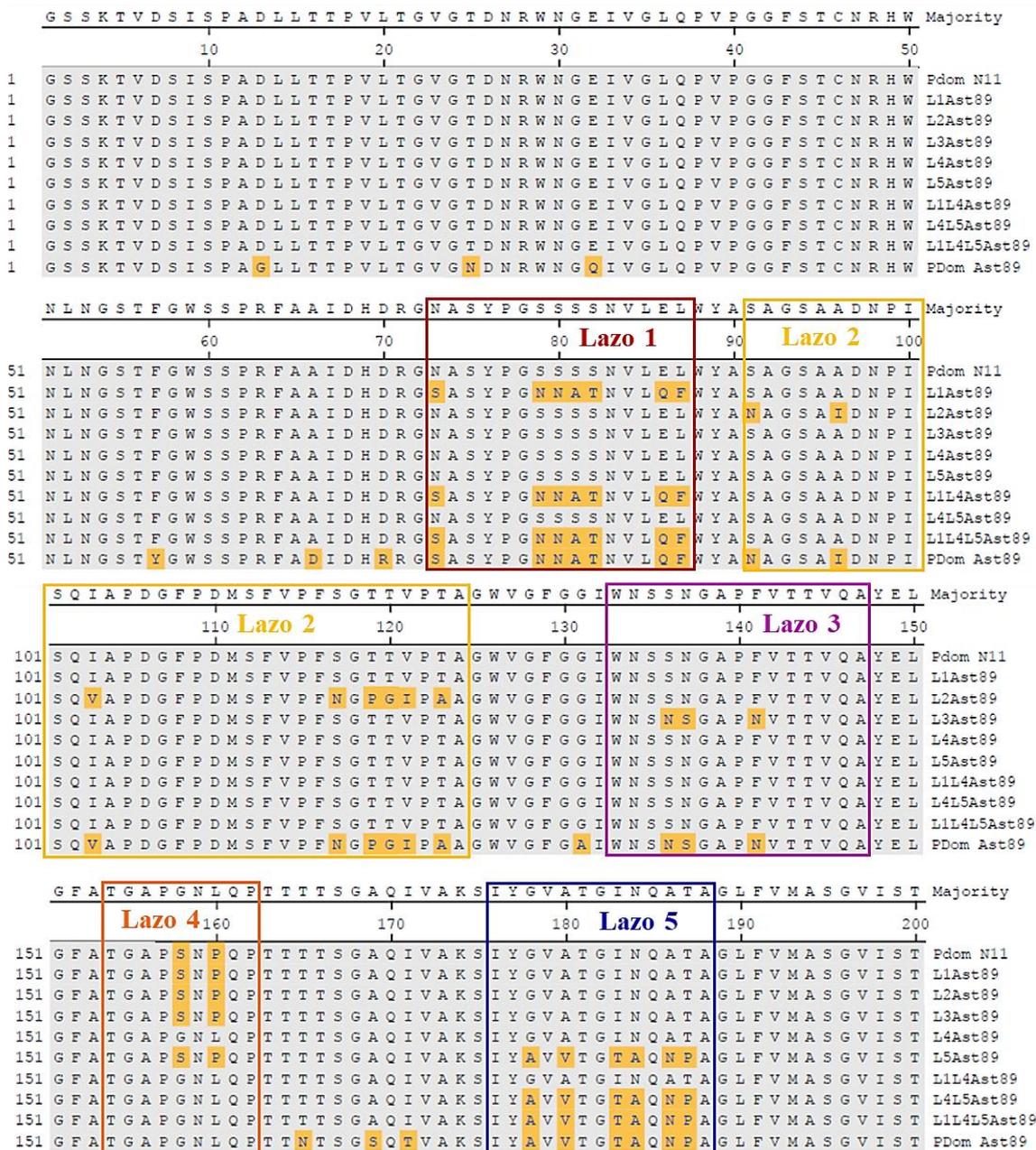


Figura S1. Alineamiento de secuencias de ADN de dominios P de RHDV-Nav10/11, RHDVG1-Ast89 y mutantes de lazos. Los recuadros indican las secuencias que corresponden a los distintos lazos del subdominio P2.



“Quiero compartir con ustedes el secreto que me ha llevado a alcanzar todas mis metas: mi fuerza reside únicamente en mi tenacidad”.

Louis Pasteur