

31 de Março de 2013

C A M E V E T

Cod: 000

TRÂMITE I

DATA: 27 de setembro de 2013

**GUIA DE PROVA DE POTÊNCIA PARA VACINAS BOVINAS
INATIVADAS QUE CONTENHAM ROTAVÍRUS BOVINO,
AGENTE VIRAL ASSOCIADO À DIARREIA NEONATAL DO
BEZERRO**

REPRESENTAÇÃO REGIONAL DA OIE PARA AS AMÉRICAS.

Paseo Colón 315, 5to. Piso "D" (C1063ACD), Buenos Aires, Argentina

Tel: (54-11) 4331-3919 / 5158 - Fax: (54-11) 4331-5162

e-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

AUTORES

Participaram da confecção deste guia as instituições representadas pelas seguintes pessoas (aparição segundo ordem alfabética), que conformam o grupo ad hoc de vacinas virais combinadas bovinas da Fundação PROSAIA:

- **Dr. Enrique Argento** (Câmara Argentina da Indústria de Produtos Veterinários – COPROVE).
- **Dra. Virginia Barros** (Analista Profissional do Departamento de Controle de Vacinas da Coordenação de Virologia. Diretoria de Laboratório Animal. Diretoria Geral de Laboratório – Controle Técnico. Serviço Nacional de Sanidade e Qualidade Agroalimentar – SENASA).
- **Dr. Hugo Gleser** (Câmara de Laboratórios Argentinos Medicinais Veterinários – CLAMEVET).
- **Dra. Marianna Ióppolo** (Câmara Argentina da Indústria de Produtos Veterinários – CAPROVE).
- **Dr. Eduardo Mórtola** (Professor titular de Imunologia Animal Aplicada e Secretário de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Veterinárias da Universidade nacional de La Plata – UNLP).
- **Dra. Viviana Parreño** (INTA. Responsável pela Seção de Vírus Entéricos - Lab VD -, Instituto de Virologia do CICVyA, INTA Castelar. Pesquisadora adjunta do CONICET).
- **Dra. María Marta Vena** (Médica veterinária. Consultora independente em pesquisa e desenvolvimento e assuntos regulatórios).

Coordenação do grupo sob a responsabilidade do Dr. Javier Pardo (Fundação PROSAIA).

Índice de Conteúdos

1. Introdução	3
2. Controle de Potência em cobaias: Objetivos e Alcance	4
2.1 Desenho da prova	5
2.1.1 Cobaias	5
2.1.2 Procedimento	6
2.1.3 Interpretação	6
2.1.4 Critérios de validação da prova em cobaias.....	7
2.1.5 Cálculos	7
2.1.6 Critério de aprovação das vacinas em avaliação	8
3. Armonização de ensaios para a região.....	8
Referências	8

GUIA DE PROVA DE POTÊNCIA PARA VACINAS BOVINAS INATIVADAS QUE CONTENHAM ROTAVÍRUS BOVINO, AGENTE VIRAL ASSOCIADO À DIARREIA NEONATAL DO BEZERRO

1. INTRODUÇÃO

O denominado Complexo da Diarreia Neonatal do Bezerro (DNT, em espanhol) é uma enfermidade multifatorial que afeta os bezerros recém-nascidos e até os 3 meses de idade. Esta síndrome representar um importante problema sanitário na indústria do gado bovino em escala mundial. As causas da enfermidade podem ser infecciosas ou não infecciosas. No entanto as infecciosas são as que originam os maiores problemas de mortalidade (Blanchard, 2012).

A etiologia desta enfermidade envolve agentes virais, bacterianos e parasitários, entre eles o Rotavírus, Coronavírus, *Escherichia coli patógenas*, *Salmonella spp.*, *Clostridium perfringens*, *Cryptosporidium spp.* e coccídios (Blanchard, 2012).

Dentro desta etiologia complexa, a infecção por Rotavírus bovino grupo A (RVA) é considerada a causa mais importante de diarreia em bezerros em escala mundial. (Badaracco et al., 2012; Blanchard, 2012; Cho et al., 2013).

O Rotavírus bovino grupo A costuma afetar os bezerros até as 8 semanas de vida, mas a susceptibilidade decresce à medida que a idade avança. A infecção por RVA bovino se restringe aos esterócitos da porção apical das microvelosidades do intestino delgado dos bezerros neonatos, e se sabe que é capaz de perturbar as superfícies absorptivas do epitélio intestinal, produzindo diarreia. Até os três meses de vida, os bezerros em geral já são suscetíveis à infecção por esse vírus (Blanchard, 2012; Dhama et al., 2009).

Entre as proteínas estruturais do vírus se destacam a glicoproteína VP7 que conforma a superfície da cápside externa e cujas variantes se denominam G-tipos e as espículas virais conformadas pela proteína VP4, cujas variantes se denominam P-tipos. Dentro dos RVA que circulam em bovinos, foram reportados os G-tipos: G1, G2, G3, G4, G5, G6, G8, G10 e G15; e os P-tipos P[1], P[5], P[11], P[14], P[17] e P[21]. No entanto, somente o G6, G10 e G8 associados a P[5], P[11] e P[1] são considerados epidemiologicamente importantes (Badaracco et al., 2011, 2012; de Verdier Klingenberg et al., 1999; Fukai et al., 2004; Garaicoechea et al., 2006).

As medidas de prevenção empregadas em âmbito global para controlar as diarreias em bezerros por RVA bovino se focalizam em tentar diminuir a severidade do quadro clínico no bezerro e o título de vírus infeccioso excretado ao meio ambiente. Como estratégia para aumentar a resistência específica dos neonatos se recomenda a vacinação de mães gestantes (60 e 30-45 dias antes do parto) para favorecer a transferência passiva via colostro de anticorpos (Acs) ao recém-nascido (Kaplon et al., ; Parreño et al., 2004; Saif and Fernandez, 1996).

Os organismos regulatórios internacionais (APHIS, USA; EMEA-CVMP, UE; OIE; VICH) não fizeram recomendações para a elaboração e controle das vacinas para rotavírus. No entanto, dado o impacto sanitário desta patologia neonatal nas explorações pecuárias do país e da região, considera-se importante o desenvolvimento e implementação de uma prova de controle de potência destas vacinas em animais de laboratório.

Neste guia se propõe o uso de uma prova de controle de potência de vacinas de RVA em cobaias que permite controlar a qualidade dos lotes de vacina que são liberados ao mercado. A prova foi estatisticamente convalidada frente à potência das vacinas obtidas na espécie de destino e possui um grau de concordância ótimo para prever a potência de cada lote da vacina nas fêmeas vacinadas. Também foi determinada a eficácia das vacinas classificadas segundo o modelo para prevenir a diarreia neonatal em bezerros colostrados artificialmente com colostro de fêmeas vacinadas vs. não vacinadas (Parreño et al., 2012). O modelo proposto representa uma ferramenta preditiva do grau de proteção que conferem os anticorpos colostrais frente à descarga viral em bezerros neonatos desafiados com RVA (Parreño et al., 2004).

Em relação ao bem-estar animal, os organismos internacionais fomentam o desenvolvimento de provas *in vitro*, a fim de evitar ou reduzir ao mínimo o uso de animais para provas experimentais de controle (Hendriksen, 2009). No caso particular destas vacinas aquosas ou oleosas inativadas, que contém uma ou duas cepas de RVA bovino, acompanhada(s) de outros agentes bacterianos (*E. coli*, *Salmonella spp*) e agentes virais, como o Coronavírus bovino, a aplicação de técnicas de controle *in vitro* é possível e merece exploração. Porém, pelo fato de apresentarem o inconveniente de que deveriam padronizar-se para cada formulação em particular (conjunto de antígenos virais inativados, bactérias e adjuvantes), ainda se considera inevitável passar por uma prova *in vivo* para avaliar a potência destes produtos (Taffs, 2001).

2. CONTROLE DE POTÊNCIA EM COBAIAS: OBJETIVOS E ALCANCE

Este guia descreve uma prova *in vivo* em animais de laboratório (cobaias) que permite avaliar a potência (imunogenicidade) e estimular a eficácia de vacinas utilizadas na prevenção da Diarreia Neonatal em Bezerros causada por RVA bovino. As cobaias apresentam a vantagem frente aos outros animais de laboratório, como ratos, que por seu maior tamanho permite que se possam tomar mostras seriadas de soro, sem comprometer

a vida do animal e ademais é uma das poucas espécies animais de laboratório que não possui um rotavírus próprio e são naturalmente soronegativos para Ac contra rotavírus. Finalmente, a avaliação sorológica é independente do tipo de adjuvante (oleoso ou aquoso) e da quantidade dos vírus inativados que compõem a formulação.

Em relação ao bem-estar animal esta prova responde aos delineamentos dos organismos internacionais ao substituir e reduzir significativamente o uso de animais em provas experimentais (Hendriksen, 2009).

Para a validação do modelo foram seguidas as recomendações internacionais para validação de métodos de controle de vacinas veterinárias, em particular vacinas combinadas (EMEA/P038/97, 1998; Taffs, 2001). Foram avaliadas paralelamente em bovinos e cobaias vacinas experimentais e comerciais, formuladas em adjuvantes oleosos e aquosos, contendo a valência RVA bovino, combinada com antígenos bacterianos e virais associados à diarreia neonatal (*E coli*, *Samonella*, Coronavirus bovino, entre outros). A imunogenicidade, medida em cobaias com o título de anticorpos IgG anti-RVA aos 30 dias pós-vacinação foi correlacionada com o título de anticorpos IgG1 anti-RVA em bovinos aos 60 dias pós-vacinação – em coincidência com o momento do parto. O isotipo IgG1 é seletivamente transferido do soro da fêmea ao colostro durante a colostrogênese e determina o grau de proteção nos bezerros neonatos (Parreño et al., 2004). As técnicas de ELISA utilizadas foram validadas sob as normas ISO 17025 e seu procedimento para soros de cobaias está detalhado no ANEXO I.

A análise realizada demonstrou altos índices de concordância entre o modelo e a espécie de destino. Os detalhes técnicos e estatísticos da validação se apresentam no ANEXO II deste guia. Esta prova pode ser utilizada para o controle de qualidade de cada série de vacina de RVA bovino a ser liberada no mercado. Trata-se de ferramenta prática tanto para as empresas produtoras de vacinas quanto para o organismo de oficial de controle, o que garante a presença de produtos padronizados e eficazes no mercado.

O modelo cobaia desenvolvido é um ensaio *in vivo*, com um número limitado mas suficiente de animais (n=6 por vacina e 4 testemunhas/placebo), o que facilita e agiliza a avaliação da potência para RVA das vacinas inativadas e combinadas que são utilizadas para prevenir as diarreias neonatais do bezerro.

2.1 Desenho da prova

2.1.1 Cobaias

São utilizados no mínimo 6 animais por cada vacina, com mais de 30 dias de idade e o peso deve ser de 400 gramas \pm 50 gramas. Podem ser utilizados machos ou fêmeas mas cada grupo deve conter animais do mesmo sexo, com um prazo de adaptação depois do ingresso à sala de inoculação de SETE (7) dias, no mínimo. É importante destacar que as cobaias são naturalmente negativos a Ac contra RVA bovino.

2.1.2 Procedimento

As cobaias são imunizadas com doses de vacina (em um intervalo de 21 dias), por via subcutânea, com um volume correspondente a 1/5 da dose bovina. Os animais são mantidos sob controle durante um mínimo de 30 dias e são tomadas amostras de soro no momento da primeira dose de vacina (0 dias pós-vacinação) e 9 dias pós-revacinação (30 DPV). Conjuntamente com a avaliação da(s) vacina(s) incógnitas (n=6), são incluídos dois grupos de cobaias, um dos quais vacinado com uma vacina de referência de potência conhecida (n=6) e o outro ficando como grupo de animais testemunhas não vacinados (n=4). Aos trinta (30) dias de iniciado o controle, os animais vacinados são sangrados, realizando-se o controle sorológico pela técnica de ELISA para a detecção de Ac contra RVA bovino (ANEXO I). De forma complementar os soros podem ser analisados por neutralização viral, técnica que permite determinar o título de Ac neutralizantes para cada um dos sorotipos de RVA incluído nas vacinas.

2.1.3 Interpretação

A análise de regressão linear do título de anticorpos anti-RVA IgG total em cobaias e IgG1 em bovinos, determinados por ELISA, realizado durante a validação do modelo cobaia para a valência RVA bovino indicou que a resposta de anticorpos induzida pela vacinação é diretamente proporcional à concentração de antígeno (Ag) contido na vacina, em ambas as espécies, e a cobaia, por ser soronegativa, apresentou maior poder discriminante que os bovinos (ensaio dose-resposta, ANEXO II) (Parreño et al., 2012).

A partir da curva de regressão linear e utilizando o método de árvores de classificação se estimaram os pontos de corte de classificação de vacinas. Estabeleceram-se dois pontos de corte para cada espécie e três categorias (Tabela 1) (ver detalhes técnicos da validação no ANEXO II) (Parreño et al., 2012).

O modelo cobaia conseguiu discriminar significativamente entre vacinas com concentrações de vírus de 10^4 , 10^5 e 10^6 UFFF/ doses ou maior. Vacinas que induzem títulos de Ac superiores a 4.0 são consideradas de imunogenicidade satisfatória, enquanto que as vacinas que superam um título de 4.46 são consideradas muito satisfatórias. Vacinas com títulos de Ac no modelo cobaia superiores a 4.0 induzem em bovinos um incremento do título IgG1 anti-RVA de 0.40 com relação a seu nível basal. As vacinas com títulos superiores a 4.46 em cobaias induzem um aumento do título de IgG1 anti-RVA nos bovinos vacinados de 0.75 e títulos finais de 3.70 no momento do parto (60 dpv).

Estes pontos de corte foram utilizados para avaliar o grau de concordância entre a espécie destino e o modelo cobaia para classificar a potência de vacinas.

Em relação à potência da vacina em cobaias e bovinos e sua eficiência para prevenir diarreia em bezerros, os estudos realizados indicaram que bezerros que recebem 1 litro de colostro de vacas não vacinadas (título de Ac inferior a 3.53), alcançam títulos de Ac em soro entre 2.4-3.01 e desenvolvem diarreia severa, enquanto que bezerros que recebem 1

litro de colostro de vacas vacinadas (título de Ac superior a 3.70) alcançam títulos de Ac em soro entre 4.21-4.81 apresentam uma redução significativa da severidade do quadro clínico (Parreño et al., 2012).

Tabela 1. **Pontos de corte Modelo Cobaio INTA / bovinos para estimar a potência de vacinas de rotavírus**

Espécie	POTÊNCIA			
	Estimada segundo o título de Ac por ELISA			
	Não satisfatória	Intermediária	Satisfatória	Muito Satisfatória
COBAIA	$\bar{y} < 1.93$	$1.93 \leq \bar{y} < 4.0$	$4.0 \leq \bar{y} < 4.46$	$\bar{y} \leq 4.46$
BOVINO Incremento título Ac (T60-T0)	$\bar{Y} < 0.33$	$0.33 \leq \bar{Y} < 0.40$	$0.40 \leq \bar{Y} < 0.75$	$\bar{Y} \leq 0.75$

X: concentração de RVA (UFF/ doses de vacina).

Pontos de corte determinados como o log₁₀ do títulos de anticorpos anti-RVA (IgG em cobaias) determinado por ELISA. Em bovinos se analisa o incremento de Ac pós-vacinação em relação ao título de Ac basal também determinados por ELISA, presentes no soro de animais vacinados com a vacina incógnita. (y) Título médio de Ac de grupos de 5 cobaias, avaliado aos 30 dias pós-vacinação (dpv); (Y) grupos de 5 bovinos avaliados aos 60 dpv. Os bovinos recebem duas doses de vacina com um intervalo de 30 dias e se observa aos 0 e 60 dpv. As cobaias recebem duas doses de vacina (1/5 do volume da dose bovina) com um intervalo de 21 dias e se observa aos 0 e 30 dpv.

A prova proposta não necessita infraestrutura nem tecnologia complexa, somente um biotério com cobaias e técnicas sorológicas correntes (ELISA) de uso rotineiro nos laboratórios de virologia, corretamente harmonizadas com normas internacionais (9.CFR, OIE, EMEA) e preferentemente validadas sob normas ISO-IEC 17025.

2.1.4 Critério de validação da prova em cobaias

A prova de potência em cobaias é considerada válida quando a média obtida do título de Ac dos animais vacinados com uma vacina de referência de qualidade satisfatória é igual ou maior ao valor esperado (superior a 4.0 em cobaias), e os animais testemunha não vacinados permanecem soronegativos para Ac contra RVA durante toda a experiência.

2.1.5 Cálculos

Serão avaliados todos os soros e os seis animais imunizados com a vacina em controle. Serão selecionados os CINCO (5) soros com maior título obtido (expresso em log₁₀ da

máxima diluição de soro que supera o cut off do ELISA) e sobre eles se realizará a média aritmética.

2.1.6 Critério de aprovação das vacinas em avaliação

Para a APROVAÇÃO da vacina submetida a controle, a média do log₁₀ dos títulos de Ac IgG anti-RVA aos 30 dpv no soro das cobaias vacinadas deverá ser maior ou igual a 4.0

3. HARMONIZAÇÃO DE ENSAIOS PARA A REGIÃO

Recomenda-se a elaboração de um painel de soros controles positivos e negativos, assim como vacinas de referência. Estes reativos de referência locais deverão estar à disposição dos usuários da região e serão utilizados para harmonizar os resultados obtidos por todos os laboratórios de ensaios que adotarem este método de controle.

A vacina de referência permitirá estabelecer a conformidade do ensaio de imunização de cobaias, enquanto que o painel de soros poderá ser utilizado como controle da técnica sorológica recomendada (ELISA) e para a padronização de outros ensaios alternativos (VN).

REFERÊNCIAS

- Badaracco, A., Garaicoechea, L., Rodriguez, D., Uriarte, E.L., Odeon, A., Bilbao, G., Galarza, R., Abdala, A., Fernandez, F., Parreno, V., 2011, Bovine rotavirus strains circulating in beef and dairy herds in Argentina from 2004 to 2010. *Veterinary microbiology* 158, 394-399.
- Badaracco, A., Garaicoechea, L., Rodriguez, D., Uriarte, E.L., Odeon, A., Bilbao, G., Galarza, R., Abdala, A., Fernandez, F., Parreno, V., 2012, Bovine rotavirus strains circulating in beef and dairy herds in Argentina from 2004 to 2010. *Veterinary microbiology* 158, 394-399.
- Blanchard, P.C., 2012, Diagnostics of dairy and beef cattle diarrhea. *The Veterinary clinics of North America* 28, 443-464.
- Cho, Y.I., Han, J.I., Wang, C., Cooper, V., Schwartz, K., Engelken, T., Yoon, K.J., 2013, Case-control study of microbiological etiology associated with calf diarrhea. *Veterinary microbiology*.
- de Verdier Klingenberg, K., Vagsholm, I., Alenius, S., 1999, Incidence of diarrhea among calves after strict closure and eradication of bovine viral diarrhea virus infection in a dairy herd. *J Am Vet Med Assoc* 214, 1824-1828.
- Dhama, K., Chauhan, R.S., Mahendran, M., Malik, S.V., 2009, Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals. *Veterinary research communications* 33, 1-23.
- EMEA/P038/97 1998. Position Paper on Batch Potency Testing Of Immunological Veterinary Medical Products, CVMP/IWP, V.M.E.U., ed. (The European Agency for the Evaluation of Medical Products).
- Fukai, K., Onoda, H., Itou, T., Sato, M., Miura, Y., Sakai, T., 2004, Genetic and serological characterization of novel serotype G8 bovine group A rotavirus strains isolated in Japan. *J Vet Med Sci* 66, 1413-1416.
- Garaicoechea, L., Bok, K., Jones, L.R., Combessies, G., Odeon, A., Fernandez, F., Parreno, V., 2006, Molecular characterization of bovine rotavirus circulating in beef and dairy herds in Argentina during a 10-year period (1994-2003). *Veterinary microbiology* 118, 1-11.

- Hendriksen, C., 2009, Replacement, reduction and refinement alternatives to animal use in vaccine potency measurement. *Expert Rev Vaccines* Mar, 313-322.
- Kaplon, J., Fremy, C., Bernard, S., Rehby, L., Aho, S., Pothier, P., Ambert-Balay, K., Impact of rotavirus vaccine on rotavirus genotypes and caliciviruses circulating in French cattle. *Vaccine* 31, 2433-2440.
- Parreño, V., Bejar, C., Vagnozzi, A., Barrandeguy, M., Costantini, V., Craig, M.I., Yuan, L., Hodgins, D., Saif, L., Fernandez, F., 2004, Modulation by colostrum-acquired maternal antibodies of systemic and mucosal antibody responses to rotavirus in calves experimentally challenged with bovine rotavirus. *Veterinary immunology and immunopathology* 100, 7-24.
- Parreño, V., Lopez, M., Vena, M., Rodriguez, D., Fillippi, J., Vega, C., Marcoppido, G., Marangunich, L., Fernández, F., 2012. Statistical validation of a guinea pig model as an alternative method for bovine rotavirus vaccines potency testing. In: 11th International Symposium on Double-Stranded RNA Viruses
San Juan, Puerto Rico, November 27 – December 1, 2012.
- Saif, L.J., Fernandez, F.M., 1996, Group A rotavirus veterinary vaccines. *The Journal of infectious diseases* 174 Suppl 1, S98-106.
- Taffs, R.E., 2001, Potency tests of combination vaccines. *Clin Infect Dis* 33 Suppl 4, S362-366.

ANEXO I

GUIA DE PROVA DE POTÊNCIA PARA VACINAS BOVINAS INATIVADAS QUE CONTENHAM ROTAVÍRUS BOVINO, AGENTE VIRAL ASSOCIADO À DIARREIA NEONATAL DO BEZERRO

PROCEDIMENTO

PROVA DE POTÊNCIA PARA IBR EM COBAIAS

Condições das cobaias. São utilizados animais de mais de 30 dias de idade, o peso deve ser de 400 gramas \pm 50 gramas. Por cada série em controle serão vacinadas no mínimo SEIS (6) COBAIAS. Podem ser utilizados machos ou fêmeas, mas cada grupo deve conter animais do mesmo sexo.

Quarentena de animais. Os animais são instalados nos racks da sala de experimentação e permanecem pelo menos SETE (7) dias sem tratamento, para sua adaptação ao manejo da alimentação, cuidado e limpeza do setor, prévio ao início dos ensaios.

Inoculação de vacinas. A vacina é aplicada por via parenteral subcutânea com 1/5 do volume da dose bovina.

Extração de sangue para obtenção de amostras do soro. Pode-se realizar por punção cardíaca, veia jugular ou veia auricular marginal.

Processamento da amostra: obtenção de sangue sem anticoagulante, separação do coágulo e obtenção do soro sanguíneo. Clarificação por centrifugação. Fracionamento em partes de 500 ul. Armazenamento a -20°C até o momento da análise. Rótulo: Nº de protocolo, vacina, nº de animal e tempo pós-vacinação.

ENSAIO DE ELISA PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA ROTAVÍRUS

É importante destacar que as cobaias (*Cavia porcellus*) são uma espécie livre de **Rotavírus grupo A** e, portanto, naturalmente soronegativos para Ac contra este agente viral e só são positivos depois de serem experimentalmente imunizados com este agente.

Utiliza-se um ELISA duplo sanduíche validado para a detecção de anticorpos anti-RVA em soro de cobaias imunizadas com vacinas de RVA. Brevemente, sensibilizam-se placas de ELISA de 96 poços com um soro hiperimune anti-RVA obtido em bovino (bezerro descolostrado, experimentalmente infectado e hiperimunizado com RVA). As placas são incubadas durante 18 horas a 4-8° C e depois de uma passagem de bloqueio se acrescenta sobrenadante clarificado de cultivos de MA-104 infectados com RVA com título viral não menor a 10⁷ UFFF/ml e título por ELISA de detecção de Ag de 1/100 (poços positivos) ou sobrenadante de células MA-104 sem infectar (poços negativos). A seguir, em ambos os poços (+ e -), são colocadas as amostras de soro em 6 diluições seriadas base 4. As vacinas possuem títulos de Ac variáveis, motivo pelo qual são feitas diluições de prova começando desde 1/256 até 1/262144 e se não se chega ao título, repete-se o ensaio a partir de uma diluição menor. A seguir agrega-se um conjugado comercial anti-IgG de cobaia

marcado com peroxidase. A reação se revela utilizando H₂O₂ /0,05% ABTS como sistema substrato / cromógeno e é detida com o acréscimo de 50 ul de SDS a 10%. A leitura das placas se realiza a 405 nm.

REATIVOS

▪ Placas de ELISA de 96 poços, NUNC Maxisorp

▪ Buffer de sensibilização de placas (carbonato/bicarbonato) pH 9,6.

Na₂CO₃ 0,159 grs.

NaHCO₃ 0,293 grs.

Água destilada c.s.p. 100 ml

Ajustar pH com NaOH/ HCl 1 N

Armazenar a 4º C (1-8º C).

▪ Buffer Ácido cítrico pH 5.0

Ácido Cítrico Mono-hidrato 0,960 grs.

NaOH 1N aprox. 10 ml para levar a pH 5,0

Água destilada c.s.p. 100 ml

Ajustar a pH: 5,0 ±0.5 com Na(OH) ó HCl 1N.

Armazenar a 4º C (1-8º C).

▪ ABTS Solução Mãe

ABTS 0,22 grs.

Buffer Ácido Cítrico 10 ml.

Fracionar em partes de 1 ml em tubos plásticos. Armazenar a -20 ± 5º C.

▪ Solução de revelado ABTS

Solução mãe ABTS 300µL

Buffer Ácido cítrico pH5 10 ml

Água oxigenada 30 volumes (H₂O₂) 10 µL

▪ Solução de freio: SDS (dodecil/lauril sulfato de sódio) a 5% em água. Armazenar a temperatura ambiente.

▪ Buffer de Lavagem (PBS, - 0,05%Tween₂₀ ; pH 7.4)

PBS pH 7.4 1000 ml

Tween₂₀ 500 µL

▪ Buffer de bloqueio e diluente. PBS/Tween₂₀ 0.05%/leite desnatado 1%, pH 7.4

Leite desnatado em pó 10 grs.

PBS / 0.05% Tween₂₀ c.s.p. 100ml

- **Anticorpo de Captura:** utiliza-se um soro hiperimune e anti-rotavírus grupo A feito em bezerro descolostrado com um título de Ac anti-RVA não menor a 1/65536.

- **Antígeno Positivo:** suspensão de Rotavírus Bovino produzido em células MA104. O vírus a utilizar deve estar clarificado e titulado neste sistema para determinar sua diluição de uso. Utilizar estoques virais que possuam título infeccioso de 10^7 UFF/ml o maior e pelo menos um sinal positivo por ELISA de detecção de Ag na diluição 1/100.

- **Antígeno negativo:** Sobrenadante clarificado de células MA-104 não infectadas (CONTROLE NEGATIVO DE INFECCÃO).

- **Anticorpo detector Anti IgG de Cobaia marcada com peroxidase:**

O ensaio foi validado utilizando estes dois reativos comerciais:

Affinity purified goat anti- Guinea Pig Ig G (H+L) peroxidase labeled, KPL, cat # 14-17-06

Peroxidase-conjugated affiniPure goat anti-guinea pig IgG(H+L), Jackson, cat# 106-035-003

- **CONTROLES**

Em cada placa se utiliza um soro **Controle Positivo** em uma diluição fixa a determinar para cada lote, um soro **Control Negativo** que é feito em uma única diluição de 1/16 e um alvo de reação (PBS). Cada uma destas amostras é feita por duplicado em cada placa de reação.

- **Controle positivo cobaia:** Pool de soros de 5 cobaias vacinadas com duas doses de vacina contendo 10^7 UFFF/ml de RVA em adjuvante oleoso (Vacina de Referência). Este soro deve possuir um título esperado de Ac IgG anti-RVA de 1/16384 e na diluição de uso no ensaio (1:1024) deve projetar uma densidade ótica corrigida (DOc) compreendida na seguinte faixa de admissão:

Média aritmética DOc controle positivo ± 1 SD =

$0.535 \leq$ médio de duas réplicas na diluição de trabalho 1:1024 ≤ 0.871

Serão consideradas adequadas aquelas placas nas quais a média de DOc do controle positivo se encontrar dentro da faixa de admissão e receber 100% de porcentagem de positividade (PP%) para dita placa.

- **Controle negativo Cobaia:** pool de soros normais de cobaias adultas não vacinadas com RVA cuja absorvância corrigida na diluição de uso seja inferior ao ponto de corte (cut off) da técnica (11% da densidade ótica corrigida do controle positivo). Realiza-se em cada placa do ensaio em duas réplicas e uma diluição de 1/16 em cada placa de reação.

- **Alvo de Reativas:** PBS.

Para cada controle são utilizados 4 poços (duas capturas positivas e suas duas capturas negativas correspondentes).

PROCEDIMENTO DO ELISA:

1. Sensibilização de placas

Preparar o volume necessário de anticorpos de captura anti-RVA em buffer de sensibilização, pH 9.6, segundo a quantidade de placas a utilizar. Colocar 100 ul por poço. Selar as placas com fita adesiva e incubar a 4°C durante 18 h.

2. Bloqueio

Descartar o conteúdo da placa. Lavar 1 vez com buffer de lavagem. Secar batendo a placa em um papel absorvente. Agregar 100 ul por poço de buffer de bloqueio e incubar 1h 37°C em atmosfera de 5% CO₂ ou em uma câmara úmida.

3. Acréscimo de Ag positivo e negativo

Descartar o conteúdo da placa. Lavar a placa 2 vezes com buffer de lavagem

Realizar a diluição de trabalho do Antígeno Positivo (Lote de Rotavírus para ELISA) em buffer de lavagem.

Diluir o Ag Negativo (MA-104 sem infectar), na mesma diluição que o Ag positivo, em buffer de lavagem.

Colocar 100ul de Ag positivo nas colunas ímpares y 100ul de Ag negativo nas colunas pares.

Incubar: 1 h 37° C

Se as placas não são usadas no momento, neste passo depois de agregar o vírus e depois das lavagens, são armazenados a -20º C (\pm 2º C) até seu momento de uso. As placas assim sensibilizadas podem ser utilizadas dentro dos três meses de preparadas.

4. Diluição e semeadura de amostras

Realizam-se 6 diluições base 4, e se inclui em cada placa duas réplicas do controle positivo, negativo e alvo de reação.

1. Descongelar as amostras a serem testadas e os controles. Para o controle de vacinas em cobaias, são feitas 6 amostras por placa (1 vacina) e um padrão (que pode ser o mesmo controle positivo analisado como uma amostra).
2. Em um tubo, realizar uma diluição de 1/16 de cada amostra em buffer de bloqueio.

Recomenda-se realizar a diluição das amostras em placas substitutas (placas de cultivo de 96 poços) e se transfere à placa de reação 100 ul de amostra.

3. Colocar 150 ul de buffer de bloqueio em toda a placa substituta. Nos poços 1H e 1G foram colocados 10ul respectivamente da diluição 1/16 da amostra "1". Nos poços 1F e 1E foram colocados 10ul respectivamente da amostra "2" e assim sucessivamente, carregam-se todas as amostras a analisar. Realizar as diluições transferindo 50 ul das colunas 1 a 6 e das colunas 7 a 12. O ensaio se inicia na diluição 1/256 até a diluição 262144.
4. Transferir 100 ul de cada diluição realizada à placa de reação da diluição mais líqüida à mais concentrada.

5. Diluição e semeadura de controles

O kit de ELISA será provido com controles padronizados que deverão ser preparados na diluição de trabalho. Por exemplo, Controle positivo (1:1024), controle negativo (1:16). Os controles (Positivo, Negativo e PBS), são preparados em tubo segundo volume necessário para todas as placas do ensaio e são carregados diretamente sobre a placa original (100 ul por poço).

1. Colocar 100 ul da diluição de Controle Positivo nos poços A7 B7 A8 e B8.
2. Colocar 100 ul da diluição do Controle Negativo nos poços A9 B9 A10 e B1.
3. Colocar 100 ul do PBS /0.05% Tween20 nos poços A11 B11 A12 e B12 (Alvo de reação). Incubar em câmara úmida durante 1 hora, a 37º C.

6. Acréscimo de Anticorpos detector conjugado com peroxidase

1. Descartar o conteúdo da placa. Lavar 4 vezes. Secar.
2. Em um tubo contendo 10 ml de buffer de bloqueio colocar a quantidade correspondente de Anticorpo Conjugado segundo sua diluição de uso.
3. Colocar 100 ul por poço em toda a placa.
4. Incubar em câmara úmida durante 1 hora, a 37º C.
5. Descartar o conteúdo da placa. Lavar 5 vezes. Secar.

7. Revelação, Leitura e Interpretação

1. Preparar 10 ml de solução reveladora. Colocar 100 ul da solução reveladora em cada poço e esperar entre 10 e 15 minutos com a placa no escuro. Realizar uma leitura de prova a 405 nm para comprovar que o controle positivo está chegando a seu valor de densidade ótica esperada.
2. Deter a reação colocando 50 ul de solução de freio (SDS 5%) em todos os poços da placa e realizar a leitura. Passar os dados da leitura a uma planilha de cálculo.
3. Realizar subtração de uma das absorvâncias das capturas positivas menos cada uma de suas respectivas negativas. Exemplo: H1 menos G1= DOc (Densidades óticas corrigidas).
4. Calcular a média das DOc do controle positivo (100% PP). Calcular o cut off de cada placa como 11% do valor da DOc do controle positivo. Calcular a média das réplicas do controle negativa e sua PP%.
5. Calcular a PP% de cada amostra em cada diluição $PP = \frac{DOc \text{ amostra}}{DOc \text{ Controle Positivo}} * 100$.

ACEITAÇÃO DO ENSAIO (CONFORMIDADE)

Os critérios descritos a seguir serão aplicados individualmente a cada placa.

- Uma placa de ensaio é considerada adequada quando a DOc do controle positivo se encontra dentro da faixa estabelecida. O controle negativo e o alvo de reativos apresentam PP% inferiores ao cut-off do ensaio (11%PP). O título do soro incluído como padrão dá valor esperado +/- uma diluição base 4 (erro do método).
- O título de Anticorpos de uma amostra se estabelece como o log₁₀ a inversa da máxima diluição cuja PP% seja menor ou igual ao Cut-off do ensaio (11%PP).

RELATÓRIO DE RESULTADOS DE QUALIDADE IMUNOGÉNICA DE VACINAS DE ROTAVÍRUS PROVADAS EM COBAIAS E SOROS AVALIADOS POR ELISA

Os resultados podem ser interpretados e utilizados para classificar uma vacina no modelo cobaia sempre que houver dado conformidade ao ensaio de ELISA e se contar com um mínimo de 5 animais com resultado para realizar o título médio de Ac induzido pela vacina.

Para declarar o ensaio de imunização adequado, os soros das cobaias imunizadas com a vacina de referência devem projetar um título médio dentro da faixa estabelecida determinado por uma carta de controle que projeta o valor médio \pm dos desvios padrão obtidos de um mínimo de 5 provas.

Para a vacina a avaliar se informa o título médio de Ac anti-RVA determinado por ELISA como a média do log₁₀ dos títulos de pelo menos 5 dos 6 animais imunizados.

As amostras negativas na mínima diluição de soro ensaiada (1/16) são expressas com um título arbitrário de 0.3 para os cálculos.

Segundo os pontos de corte do modelo cobaia para RVA as vacinas podem ser classificadas como de imunogenicidade baixa, intermediárias, satisfatória ou muito satisfatória.