

16 de marzo del 2012

C A M E V E T

Cod: 000

TRÁMITE III

FECHA: 27 de septiembre de 2013

GUÍA DE PRUEBA DE POTENCIA PARA VACUNAS
BOVINAS INACTIVADAS QUE CONTENGAN HERPES VIRUS
BOVINO (BoHV-1) AGENTE CAUSAL DE LA
RINOTRAQUEÍTIS INFECCIOSA BOVINA (IBR)



Guía nº 1 - G.B.

AUTORES

Participaron en la confección de la guía las instituciones representadas por las siguientes personas (aparición según orden alfabético), que conforman el grupo ad hoc de vacunas virales combinadas bovinas de la Fundación PROSAIA:

- **Dr. Enrique Argento** (Cámara Argentina de la Industria de Productos Veterinarios - CAPROVE).
- **Dra. Virginia Barros** (Analista Profesional en el Departamento de Control de Vacunas de la Coordinación de Virología. Dirección de Laboratorio Animal. Dirección General de Laboratorio y Control Técnico. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria – SENASA)
- **Dr. Hugo Gleser** (Cámara de Laboratorios Argentinos Medicinales Veterinarios - CLAMEVET).
- **Dra. Marianna Ióppolo** (Cámara Argentina de la Industria de Productos Veterinarios - CAPROVE).
- **Dr. Eduardo Mórtola** (Profesor Titular de Inmunología Animal Aplicada y Secretario de Posgrado, Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata – UNLP)
- **Dra. Viviana Parreño** (INTA. Responsable de la Sección de Virus Entéricos - Lab VD -, Instituto de Virología del CICVyA, INTA Castelar. Investigadora adjunta del CONICET)
- **Dra. María Marta Vena** (Médica veterinaria. Consultora independiente en investigación y desarrollo y asuntos regulatorios).

Coordinación del grupo a cargo del Dr. Javier Pardo (Fundación PROSAIA).

Tabla de contenidos

1. Introducción	4
2. Control de Potencia en Cobayos: Objetivos y Alcance	5
Antecedentes del modelo cobayo	6
Criterio de validación de la prueba en cobayos	8
Criterio de aprobación de la vacuna según prueba cobayo.....	9
Armonización de ensayos para la región	9
3. Referencias	10
Anexo I.....	12

POTENCIA para vacunas bovinas inactivadas que contengan en su formulación herpesvirus bovino 1 (BoHV-1) agente causal de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR)

1. INTRODUCCION

El herpesvirus bovino 1 (BoHV-1) es el agente etiológico de la rinotraqueitis infecciosa bovina/vulvovaginitis pustular infecciosa (RIB/VPI), enfermedad del ganado bovino doméstico y salvaje que provoca un amplio rango de manifestaciones clínicas que incluyen, rinotraqueitis, vulvovaginitis, balanopostitis pustular infecciosa, conjuntivitis, aborto, enteritis y encefalitis (1, 2, 3).

Luego de la infección respiratoria o genital, el BoHV-1 se establece de forma latente en los ganglios nerviosos. Situaciones de estrés, pueden inducir la reactivación de la infección latente y el virus puede excretarse de modo intermitente (1, 3).

La infección induce una respuesta de anticuerpos y una respuesta inmune celular en 7–10 días. Los anticuerpos neutralizantes pueden persistir hasta 5 años luego de la infección, pero se necesita de reestimulaciones (reactivación o vacunación) para mantener sus títulos en niveles detectables por la técnica de neutralización viral. Por el contrario, los anticuerpos totales, evaluados por ELISA, permanecen detectables durante toda la vida (4-6).

En general, las vacunas evitan la manifestación de síntomas clínicos graves y reducen la liberación del virus después de la infección, pero no evitan la infección (1,2). En varios países de Europa se están realizando campañas de erradicación con o sin vacunación (obligatorias y/o voluntarias). La infección por BoHV-fue erradicada en Noruega, Finlandia, Suecia, Austria, Dinamarca, Suiza y algunas regiones de Italia y Alemania (1,7). En el resto del mundo la infección es endémica y con prevalencias elevadas (8, 9, 10, 11).

En la actualidad se dispone de varias vacunas con BoHV-1 atenuado e inactivado en la región. En Argentina y Uruguay las únicas vacunas admitidas por las autoridades regulatorias son a virus inactivados. Las vacunas contienen cepas del virus que por lo general se han multiplicado durante múltiples pasajes en cultivo celular. Las vacunas inactivadas contienen altos niveles de virus inactivados o porciones de las partículas víricas (glicoproteínas) suplementadas con un adyuvante para estimular una respuesta inmune adecuada. Las vacunas inactivadas se administran por vía intramuscular o subcutánea. En varios países existen vacunas marcadoras o DIVA (que permiten la diferenciación entre animales infectados y vacunados). Estas vacunas marcadoras se basan en mutantes delecionados o en una subunidad del virión, por ejemplo, la glicoproteína E (12). Este tipo de vacunas se utiliza en Europa en los países que aplican programas de erradicación con

campañas de vacunación (1, 7). En países endémicos, los programas de vacunación intensiva pueden reducir la prevalencia de los animales infectados. (1).

Los organismos de control internacional (APHIS, USA; EMEA-CVMP, UE; OIE; VICH) (1, 2, 13, 14) exigen para la aprobación de vacunas que contienen IBR ensayos de potencia y eficacia en la especie de aplicación, que implican la vacunación y desafío de bovinos susceptibles y seronegativos. Una vez aprobado el producto, agencias como el CVB, USDA de Estados Unidos de Norteamérica, permiten la realización de ensayos *in vitro* para controlar la potencia de vacunas virales aplicando el método de rectas paralelas en comparación con una vacuna de referencia [Title 9, Code of Federal Regulations (9 CFR) 113.8(a)(3)(ii)]. Sin embargo, hasta tsnto no se cuente con métodos *in vitro* específicos, el control de cada serie de vacuna inactivada a liberar debe realizarse por medio de una prueba de potencia que determine la inmunogenicidad del producto en bovinos o en otro modelo animal de laboratorio (*prueba in vivo*) que haya sido estadísticamente validado y posea un grado de concordancia aceptable respecto de la prueba de potencia en la especie de destino. También es altamente deseable que el modelo en cuestión sea validado como herramienta predictiva del grado de protección que conferirá la vacuna frente a la descarga viral en bovinos seronegativos (1, 2, 13, 14). La dificultad de contar con bovinos seronegativos y el elevado costo de las pruebas de inmunogenicidad en el hospedador natural, no permite realizar en forma rutinaria esta prueba de potencia y eficacia en la especie blanco. Es por ello que se decidió desarrollar y validar una prueba estandarizada en animales de laboratorio (cobayos) que permita evaluar la potencia de cada lote de vacuna, garantizando así la presencia en el mercado de productos estandarizados y eficaces.

En relación al bienestar animal, los organismos internacionales fomentan el desarrollo de pruebas *in vitro*, para evitar o reducir al mínimo el uso de animales de para pruebas experimentales de control (15, 16). En el caso particular de estas vacunas, simples o combinadas e inactivadas, la aplicación de estas técnicas es posible y merece su exploración, pero dado que presentan el inconveniente de que deberían estandarizarse para cada formulación en particular (conjunto de antígenos inactivados y adyuvantes, vacunas a sub unidades y vacunas a DNA), aún se considera inevitable pasar por una prueba *in vivo* para evaluar la Potencia de estos productos (17).

2. CONTROL DE POTENCIA EN COBAYOS: OBJETIVOS Y ALCANCE

El modelo cobayo desarrollado, si bien se trata de un ensayo *in vivo*, el número de animales a utilizar (n=6 por vacuna y 4 testigos/placebos) y la cantidad de extracciones de sangre se reduce al mínimo. Los cobayos presentan la ventaja frente a otros animales de laboratorio, como ratones, que por su mayor tamaño permiten que se puedan tomar muestras seriadas de suero, sin comprometer la vida del animal. Además, con el volumen de muestra obtenida se puede evaluar la calidad de las vacunas polivalentes para todos los antígenos virales que la componen; las que, en algunos casos llegan a contener hasta 4 valencias de estos 5 agentes: herpesvirus bovino, virus de la diarrea viral bovina, virus

respiratorio sincicial, virus de parainfluenza 3, rotavirus bovino. Algunas vacunas para prevenir las diarreas neonatales del ternero también incluyen coronavirus bovino en su formulación.

Finalmente, la evaluación serológica es independiente del tipo de adyuvante (oleoso o acuoso) y de la cantidad y calidad de los virus inactivados que componen la formulación.

Antecedentes del modelo de cobayo

La prueba para control de vacunas virales en cobayos se basa en la inmunización de 6 cobayos con dos dosis de vacuna (en un intervalo de 21 días), por vía subcutánea, de un volumen correspondiente a 1/5 de la dosis bovina. Los animales se mantienen bajo estudio durante un mínimo de 30 días y se toman muestras de suero al momento de la primera dosis de vacuna (0 días post-vacunación) y 9 días post-revacunación. Conjuntamente con la evaluación de la/s vacuna/s incógnitas (n=6), se incluyen dos grupos de cobayos, uno vacunado con *una vacuna de referencia* de potencia conocida (n=6) y un grupo de animales testigos no vacunados (n=4). A los treinta (30) días de iniciado el control se sangran los animales vacunados, realizándoles el control serológico por ELISA y neutralización viral. Es importante destacar que los cobayos son una especie libre de BoHV-1 y, por lo tanto, naturalmente seronegativos para anticuerpos (Ac) contra este agente viral.

A partir de los resultados obtenidos desde el año 2008, donde todos los sueros de los cobayos fueron negativos al inicio de la prueba, podemos recomendar el control anual de los animales reproductores de la colonia, suprimiendo así el muestreo de los animales al inicio, tomando solo muestras al finalizar la prueba (30 dpv) en los grupos vacunados y testigos.

La validación del modelo cobayo para la valencia IBR, a partir del análisis de regresión lineal del título de Ac determinado por ELISA y neutralización viral (VN), indicó que la respuesta de anticuerpos inducida por las vacunas de BoHV-1 en bovinos y cobayos fue directamente proporcional a la concentración de antígeno (Ag) contenido en la vacuna (ensayo dosis-respuesta). El modelo cobayo fue capaz de discriminar significativamente entre vacunas formuladas con concentraciones de Ag de 1 log de diferencia, tanto por ELISA como por VN. A partir de los resultados obtenidos en la curva dosis-respuesta, se estimaron puntos de corte o rango de títulos de Ac anti-BoHV-1 que permiten diferenciar las vacunas según la inmunogenicidad inducida en cobayos y bovinos. Se establecieron dos puntos de corte y tres categorías por ELISA (Tabla 1) y VN (Tabla 2). Finalmente, vacunas representativas de cada categoría fueron evaluadas en una prueba de desafío experimental con IBR en bovinos seronegativos y se estableció la relación del título de Ac en cobayos, bovinos y el grado de protección frente a la infección (18).

ESPECIE	POTENCIA DE LA VACUNA ELISA		
	NO SATISFACTORIA	SATISFACTORIA	MUY SATISFACTORIA
COBAYO	$\bar{y} < 1.93$	$1.93 \leq \bar{y} < 3.02$	$3.02 \leq \bar{y}$
BOVINO	$\bar{Y} < 1.69$	$1.69 \leq \bar{Y} < 2.72$	$2.72 \leq \bar{Y}$

Tabla 1. Puntos de corte determinados por ELISA expresados como el log10 de la inversa de la dilución de suero analizado que resulta positiva en el ensayo. Título promedio de Ac de grupos de 5 cobayos, evaluado a los 30 días post vacunación (dpv) y grupos de 5 bovinos seronegativos evaluados a los 60 dpv. Los bovinos reciben dos dosis de vacuna con un intervalo de 30 días según lo que recomiendan los laboratorios productores y se muestrean a los 0 y 60 dpv, dado que este punto representa el pico o *plateau* de la respuesta de Ac contra BoHV-1. Los cobayos reciben dos dosis de vacuna (1/5 del volumen de la dosis bovina) con un intervalo de 21 días y se muestrean a los 0-30 dpv. El protocolo de vacunación aplicado en los cobayos permite obtener una cinética de respuesta de Ac similar a la de la especie de destino, pero se reducen los tiempos en 30 días, resultando en una prueba más rápida y económica que la prueba en bovinos.

Títulos de Ac determinados por ELISA mayores a 3.02 en cobayos y 2.72 en bovinos se asociaron a vacunas de potencia muy satisfactorias. Vacunas que indujeron títulos de Ac entre 3.02 -1.93 en cobayos y 2.72-1.69 en bovinos resultaron satisfactorias (18). En cambio, vacunas que inducen títulos de Ac inferiores a 1.93 en cobayos y 1.69 en bovinos se consideran no satisfactorias para su comercialización.

ESPECIE	POTENCIA DE LA VACUNA neutralización viral (VN)		
	NO SATISFACTORIA	SATISFACTORIA	MUY SATISFACTORIA
COBAYO	$\bar{y} < 1.31$	$1.31 \leq \bar{y} < 2.05$	$2.05 \leq \bar{y}$
BOVINO	$\bar{Y} < 1.27$	$1.27 \leq \bar{Y} < 1.96$	$1.96 \leq \bar{Y}$

Tabla 2. Puntos de corte determinados por VN, expresados como títulos de Ac neutralizantes calculados por el método de Reed y Muench. Título promedio de Ac de grupos de 5 cobayos, evaluado a los 30 días post vacunación (dpv) y grupos de 5 bovinos seronegativos evaluados a los 60 dpv. Los bovinos reciben dos dosis de vacuna con un intervalo de 30 días y se muestrean a los 0 y 60 dpv. Los cobayos reciben dos dosis de vacuna (1/5 del volumen de la dosis bovina) con un intervalo de 21 días y se muestrean a los 0-30 dpv.

Títulos de Ac neutralizantes por encima de 2.05 en cobayos y 1.96 en bovinos se asociaron a vacunas de potencia muy satisfactorias. Vacunas que indujeron títulos de Ac entre 2.05-1.31 en cobayos y 1.96-1.27 en bovinos resultaron satisfactorias. En cambio, vacunas que inducen títulos de Ac inferiores a 1.31 en cobayos y 1.27 en bovinos se consideran no satisfactorias, y por ende, no aptas para su comercialización.

Tanto por ELISA como por VN, las vacunas clasificadas como muy satisfactorias o satisfactorias cumplen con los requisitos exigidos por el 9.CFR de USA y el manual de diagnóstico y vacunas de los animales terrestres de la OIE para su aprobación. En relación a la protección frente a la infección se exige la reducción de 1/100 o mayor del título de virus infeccioso excretado en los animales vacunados respecto al título excretado por los controles no vacunados. En el ensayo de desafío efectuado con vacunas representativas de las categorías muy satisfactoria y satisfactoria, en los animales vacunados con ambas vacunas se reduce significativamente la cantidad de virus excretado respecto del control. A su vez, el virus excretado por animales vacunados con la vacuna muy satisfactoria fue significativamente menor al excretado por el grupo que recibió la vacuna satisfactoria. En relación los signos clínicos, la OIE exige para el grupo vacunado una reducción de la duración de la enfermedad en al menos tres días o más, respecto del grupo control. Este requisito sólo fue logrado por la vacuna muy satisfactoria. Sin embargo cuando se utilizan mediciones más apropiadas para evaluar la enfermedad, como el área bajo la curva que contemplan el grado de severidad y la duración del cuadro clínico, ambas categorías de vacunas reducen significativamente los signos de enfermedad (18).

A partir de este criterio, para evaluar el grado de concordancia entre el modelo cobayo y los bovinos, se realizaron 63 pruebas en paralelo en ambas especies que incluyeron las vacunas calibradoras utilizadas en el ensayo dosis-respuesta, grupos inoculados con placebos, grupos no vacunados y 22 vacunas comerciales de calidad desconocida y se obtuvo como estimación de la concordancia un índice kappa (K) =0.894; ASE = 0.041; 95% CI 0.813–0.974; $p < 0.0001$, para Ac determinados por ELISA y K=0.876, ASE = 0.050; 95%CI 0.777–0.971; $p < 0.0001$, para Ac neutralizantes, lo que indica una muy buena concordancia entre la potencia estimada por el modelo cobayo y la obtenida en la especie destino (19).

El modelo cobayo logró predecir adecuadamente no sólo la calidad inmunogénica de las vacunas, sino también su grado de eficacia frente al desafío experimental en bovinos. La prueba propuesta no necesita infraestructura ni tecnología compleja, sólo un bioterio con cobayos y técnicas serológicas corrientes (ELISA, VN) de uso rutinario en los laboratorios de virología, correctamente armonizadas con normas internacionales (9.CFR, OIE, EMEA) y preferentemente validadas bajo normas ISO-IEC 17025 (20, 21, 22, 23).

Criterio de validación de la prueba en cobayos

La prueba de potencia en cobayos se considera válida cuando el promedio obtenido del título de Ac de los animales vacunados con una vacuna de referencia resulta el valor esperado (24), y los animales controles no vacunados (testigos) permanecen seronegativos para Ac contra BoHV-1 durante toda la experiencia.

Criterio de aprobación de la vacuna según la prueba de potencia en cobayo

a) ELISA

Se evaluarán todos los sueros de los animales inmunizados con la vacuna en control. Se seleccionarán CINCO (5) de los sueros con mayor título obtenido y sobre ellos se realizará el promedio. Para la **APROBACIÓN** de la vacuna sometida a control, el promedio de los títulos de Ac a los 30 dpv deberá ser mayor o igual a **1.93** por la técnica de ELISA para BoHV-1.

b) NEUTRALIZACION VIRAL

Se evaluarán todos los sueros de los cobayos inmunizados con la vacuna sometida a control. Se seleccionarán CINCO (5) de los sueros con mayor título obtenido y sobre ellos se realizará el promedio. Para la **APROBACIÓN** de la vacuna sometida a control, el promedio de los títulos de Ac a los 30 dpv deberá ser mayor o igual a **1.31** por la técnica de VN para BoHV-1.

Armonización de ensayos para la región

Se elaborará un panel de sueros controles positivos y negativos, así como vacunas de referencia, que estarán a disposición de los usuarios de la región para armonizar los resultados obtenidos por cada laboratorio de ensayos que adopte este método de control. Los sueros de referencia locales (de cobayos y bovinos) tendrán trazabilidad en las técnicas descritas contra los sueros bovinos de referencia europeos (EU1, EU2 y EU3) provistos por los laboratorios de referencia de la OIE.

REFERENCIAS

- 1- OIE. Chapter 2.4.13. Infectious Bovine Rhinotracheitis/Infectious Pustular Vulvovaginitis. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Paris, France; Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2010. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.13_IBR_IPV.pdf
- 2- CFR.113.216. Bovine Rinotracheitis Vaccine, killed virus, editor.: US Government printing office, 1985, : 670-1.
- 3- Pidone, C.L., Galosi, C.M., Etcheverrigaray, M.E. Herpesvirus bovinos 1 y 5. Artículo de revisión. *Analecta veterinaria* 1999; 19, ½:40-50.
- 4- Thiry J, Dams L, Muylkens B, Thiry E. Isolation of cervid herpesvirus 1 from the genital tract of a farmed red deer in Northern France. *Vet J* 2009, doi:10.1016/j.tvjl.2009.11.021.
- 5- Thiry J, Saegerman C, Chartier C, Mercier P, Keuser V, Thiry E. Serological evidence of caprine herpesvirus 1 infection in Mediterranean France. *Veterinary microbiology* 2008 Apr 30;128(3-4):261-8.
- 6- das Neves CG, Thiry J, Skjerve E, Yoccoz NG, Rimstad E, Thiry E, et al. Alphaherpesvirus infections in semidomesticated reindeer: a cross-sectional serological study. *Veterinary microbiology* 2009 Nov 18;139(3-4):262-9.8- Campos FS, Franco AC, Hubner SO, Oliveira MT, Silva AD, Esteves PA, et al. High prevalence of co-infections with bovine herpesvirus 1 and 5 found in cattle in southern Brazil. *Veterinary microbiology* 2009 Oct 20;139(1-2):67-73.
- 7- Ackermann M, Engels M. Pro and contra IBR-eradication. *Veterinary microbiology* 2006 Mar 31;113(3-4):293-302.
- 8- Campos FS, Franco AC, Hubner SO, Oliveira MT, Silva AD, Esteves PA, et al. Highprevalence of co-infections with bovine herpesvirus 1 and 5 found in cattle insouthern Brazil. *Vet Microbiol* 2009;139(1-2):67-73.
- 9- Odeón ACS, E.J.A, Paloma, E.J.,Leunda, M.R., Fernández Sainz, I.J., Pérez SE, Kaiser, G.G., Draghi, M.G.; Cetrá, B.M. Cano, A. . Seroprevalencia de la Diarrea Viral Bovina, Herpesvirus Bovino y Virus Sincicial Respiratorio en Argentina. *Revista de Medicina Veterinaria* 2001;82(4):216-20.
- 10- Campero CM, Moore DP, Odeon AC, Cipolla AL, Odriozola E. Aetiology of bovine abortion in Argentina. *Vet Res Commun* 2003 Jul;27(5):359-69.
- 11- Moore DP, Campero CM, Odeon AC, Bardon JC, Silva-Paulo P, Paolicchi FA, et al. Humoral immune response to infectious agents in aborted bovine fetuses in Argentina. *Rev Argent Microbiol* 2003 Jul-Sep;35(3):143-8.
- 12- Puntel MR, A., Sadir A, Borca, M., inventor P040102842. Acta N° 02 01 04305, assignee. Método para obtener la cepa mutada recombinante del virus Herpes Bovino de tipo 1, plásmido vector y vacuna. Argentina. 2002 11-11-2002.
- 13- EMEA/140/97. Position Paper on Compliance of Veterinary Vaccines with Veterinary Vaccine Monographs of The European Pharmacopoeia. In: CVMP VMEU, editor.: The European Agency for the Evaluation of Medical Products

- 14- EMEA/P038/97. Position Paper on Batch Potency Testing Of Immunological Veterinary Medical Products. In: CVMP/IWP VMEU, editor.: The European Agency for the Evaluation of Medical Products, 1998.
- 15- Hendriksen C. Replacement, reduction and refinement alternatives to animal use in vaccine potency measurement. *Expert Rev Vaccines* 2009 Mar;Mar:313-22. Halder M, Hendriksen C, Cussler K, Balls M. ECVAM's contributions to the implementation of the Three Rs in the production and quality control of biologicals. *Altern Lab Anim* 2002 Jan-Feb;30(1):93-108.
- 16- Hendriksen CF. Validation of tests methods in the quality control of biologicals. *Dev Biol Stand* 1999;101:217-21.
- 17- Taffs RE. Potency tests of combination vaccines. *Clin Infect Dis* 2001 Dec 15;33 Suppl 4:S362-6.
- 18- Parreño, V; López; MV; Rodriguez, D; Vena, MM, Izuel, M; Filippi, J; Romera, A; Faverin, C; Bellinzoni, R, Fernandez, F and Marangunich, L. Development and Statistical Validation of a Guinea Pig model for Vaccine Potency testing against Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus (IBR). *Vaccine* 28 (2010) 2539–2549.
- 19- Viera AJ, Garrett JM. Understanding interobserver agreement: the kappa statistic. *Fam Med* 2005 May;37(5):360-3.
- 20- Parreño, Viviana, Romera, S. Alejandra; Makek, Lucia; Rodriguez, Daniela ; Malacari, Dario; Maidana Silvina; Comparé Diego; Combessies, Gustavo; Vena, Maria Marta ; Garaicoechea, Lorena; Wigdorovitz, Andrés; Marangunich, Laura and Fernandez, Fernando. Standardization and Statistical Validation under ISO/IEC 17025 standards of an indirect ELISA to detect antibodies against BoHV-1 in Bovine and Guinea Pig serum. *J. Virol. Methods*, 2010 Oct;169(1):143-53.
- 21- Kramps JA, Banks M, Beer M, Kerkhofs P, Perrin M, Wellenberg GJ, et al. Evaluation of tests for antibodies against bovine herpesvirus 1 performed in national reference laboratories in Europe. *Veterinary microbiology* 2004 Sep 8;102(3-4):169-81.
- 22- OIE. Principles of Validation of Diagnosis Assays For Infectious Diseases. In: *annual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Paris, France: OIE, 2008: 34-45.
- 23- Virginia Barros, Viviana Parreno, Daniela Rodriguez, Valeria Gonzalez, Ricardo D'Aloia, Laura Marangunich, Virginia Lopez, Fernando Fernandez, Eduardo Maradei. Implementation of the INTA Guinea pig model as the official test to evaluate the immunogenicity of BoHV-1 inactivated vaccines present in the Argentinean market. 31st Annual Meeting American Society for Virology, University of Wisconsin-Madison, July 21 - 25, 2012.

ANEXO I

DE LA GUÍA DE PRUEBA DE POTENCIA Y EFICACIA PARA VACUNAS BOVINAS QUE CONTENGAN EN SU FORMULACIÓN HERPES VIRUS BOVINO (BOHV-1) AGENTE CAUSAL DE LA RINOTRAQUEÍTIS INFECCIOSA BOVINA (IBR)

PROCEDIMIENTO

PRUEBA DE POTENCIA PARA IBR EN COBAYOS

Condiciones de los cobayos. Se utilizan animales mayores a 30 días de edad y el peso debe ser de 400 gramos \pm 50 gramos. Por cada serie en control se vacunarán como mínimo SEIS (6) COBAYOS. Pueden utilizarse machos o hembras pero cada grupo debe contener animales del mismo sexo.

Cuarentena de animales. Los animales se instalan en los racks de la sala de experimentación y permanecen al menos de SIETE (7) sin tratamiento, para su adaptación al manejo de alimentación, cuidado y limpieza del sector, previo al inicio de los ensayos.

Inoculación de vacunas. La vacuna se aplica por vía parenteral subcutánea con 1/5 del volumen de la dosis bovina.

Extracción de sangre para obtención de muestras de suero. Se puede realizar por punción cardiaca, vena yugular o la vena auricular marginal.

Procesamiento de la muestra: obtención de sangre sin anticoagulante, separación del coagulo y obtención del suero sanguíneo. Clarificación por centrifugación. Fraccionamiento en alícuotas de 500 ul. Almacenamiento a -20°C hasta el momento de análisis. Rótulo: Nº de protocolo, vacuna, nº de animal y tiempo postvacunación.

CONTROLES SEROLÓGICOS PARA LA PRUEBA DE POTENCIA EN COBAYOS

Es importante destacar que los cobayos son una especie libre de BoHV-1 y por lo tanto naturalmente seronegativos para Ac contra este agente viral y solo resultan positivos luego de ser experimentalmente inmunizados con este agente.

ENSAYO DE ELISA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA IBR

Se utiliza un ELISA indirecto validado para la detección de anticuerpos anti-BoHV-1. (20). Brevemente, se sensibilizan placas con virus BoHV-1, obtenido a partir de células MDBK infectadas (pocillo positivo), o células MDBK como control negativo de infección (pocillo negativo). La concentración óptima de virus y células no infectadas para sensibilizar las placas se determina por titulación cruzada para cada lote producido y es constante para toda la placa. Los sueros se ensayan en ambos pocillos (+ y -) en 6 diluciones seriadas base 4 comenzando desde una dilución mínima de 1/40. El ensayo se revela utilizando como

anticuerpo detector un Ac anti IgG(H+L) de cobayo marcado con peroxidasa. Como sistema sustrato cromógeno se utiliza H₂O₂/ABTS y la lectura se realiza en un lector de ELISA a 405 nm.

REACTIVOS

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

Na₂CO₃ 0,159 grs.

NaHCO₃ 0,293 grs.

Agua destilada c.s.p. 100 ml

Ajustar pH con NaOH/ HCl 1 N

Almacenar a 4° C (1-8° C).

▪ Buffer Ácido cítrico pH 5.0

Ácido Cítrico Monohidrato 0,960 grs.

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

Agua destilada c.s.p. 100 ml

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

Almacenar a 4° C (1-8° C).

▪ ABTS Solución Madre

ABTS 0,22 grs.

Buffer Ácido Cítrico 10 ml.

Fracccionar en alícuotas de 1 ml en tubos plásticos. Almacenar a -20 ± 5° C.

▪ Solución de revelado ABTS

Solución madre ABTS 300µL

Buffer Ácido cítrico pH5 10 ml

Agua oxigenada 30 volúmenes (H₂O₂) 10 µL

▪ Solución de frenado: SDS (dodecil/lauril sulfato de sodio) al 5% en agua. Almacenar a temperatura ambiente.

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

PBS pH 7.4 1000 ml

Tween₂₀ 500 µL

▪ Buffer de bloqueo y diluyente. PBS/Tween₂₀ 0.05%/OVA 1%, pH 7.4

Tween₂₀ 500ul.

PBS 1X 1000 ml.

Ovoalbúmina 10 gramos.

Fracccionar en alícuotas de 50 ml en tubos plásticos. Almacenar a -20 ± 5° C.

REACTIVOS PARA SENSIBILIZACIÓN

Control de Captura Positivo- Antígeno: Preparado a partir de cultivos de células MDBK infectados con cepas de BHV-1 de referencia.

Control de Captura Negativo: Preparado a partir de cultivos de células MDBK.

Anticuerpo detector CONJUGADO

Conjugado Anti IgG de Cobayo marcado con peroxidasa. Pueden ser utilizados:

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

Nota: Conjugados de otras marcas o conjugados producidos internamente previamente

verificados/validados como óptimos para ser utilizados en el ensayo de ELISA pueden utilizarse luego de la titulación correspondiente frente a sueros de referencia.

CONTROLES

Control positivo cobayo: Pool de sueros de 5 cobayos vacunados con dos dosis de vacuna conteniendo 10^7 DICT₅₀/ml de BoHV-1 en adyuvante oleoso (Vacuna de Referencia). Se considerarán conformes aquellos ensayos en los cuales el control positivo se encuentre dentro del valor promedio ± 1 desvío Standard (SD)

valor promedio ± 1 SD = 0.520 \leq 0.740 \leq 0.960

Dicho suero, analizado por seroneutralización debe arrojar un título de anticuerpos neutralizantes contra BoHV-1 entre 2.4 y 3.0 (Título expresado según el método de Reed y Muench).

Control negativo cobayo: Suero de cobayo cuya absorbancia corregida en la dilución de uso resulte menor al punto de corte (cut off) de la técnica (40% de la absorbancia corregida del control positivo).

Blanco de Reactivos: PBS.

Para cada uno de los controles se utilizan 4 pocillos (dos capturas positivas y sus dos capturas negativas correspondientes). Se recomienda además, incluir en cada ensayo una muestra positiva de título conocido y otra muestra negativa (sueros estándares internos). Estas muestras se siembran aleatoriamente en distintos lugares en al menos dos de las placas del ensayo y se corren en todos los ensayos.

PROCEDIMIENTO DEL ELISA:

Sensibilización de placas

1. Realizar la dilución de uso del Antígeno y su control de captura negativo en Buffer de sensibilización de placas, pH 9.6. Utilizar placas de ELISA de 96 pocillos "tipo immulon 1b". Colocar 50 μ l de del antígeno en las en las filas B-D-F-H y 50 μ l de captura negativa en las filas A-C-E-G. Incubar durante 17 horas ± 2 hs, entre 4 $^{\circ}$ C y 8 $^{\circ}$ C.
2. Descartar el contenido de la placa. Lavar 3 veces con buffer de lavado (PBS/Tween₂₀ 0,05 %, pH 7,4)
3. Agregar 100 μ l /pocillo de Buffer de bloqueo (PBS Tween₂₀ 0,05%/OVA 10%, pH 7.4). Incubar en cámara húmeda durante 1 hora, a 37 $^{\circ}$ C.
4. A continuación descartar el bloqueo, lavar 3 veces y se puede proceder con el ensayo o guardar la placa a -20 $^{\circ}$ C, durante un máximo de 30 días.

Dilución y sembrado de muestras

5. Para la dilución de las muestras se recomienda el uso de placas de cultivo de 96 pocillos. Colocar 195 ul de buffer de bloqueo en la columna 1 y 7 y 150 ul en las columnas restantes.
6. Agregar 5 ul de los sueros a analizar y colocarlos en pares de pocillos 1:AB, 1CD, 1EF, 1GH, 7CD, 7EF, 7 GH (dilución inicial de suero 1/40). Entran 7 muestras por placa. Los pocillos 7-12 AB se destinan a los controles del ensayo.
7. Realizar diluciones base 4, transfiriendo 50 ul de 1-6, descartar los tips. Con nuevos tips realizar las diluciones de 7-12.
8. Transferir 50 ul de cada dilución realizada a la placa de reacción desde la dilución más diluida a la más concentrada.

Dilución y sembrado de controles

9. El kit de ELISA será provisto con controles estandarizados que deberán prepararse de la siguiente forma: Coloque en sendos tubo, 200 ul de diluyente (PBS Tween₂₀ Ova 10% pH 7.4), y 4ul de Suero Control Positivo y Suero Control Negativo, respectivamente. Homogeneizar.
10. Colocar 50 ul de la dilución del Control Positivo en los pocillos A7 B7 A8 y B8 y 50 ul de la dilución del Control Negativo en los pocillos A9 B9 A10 y B10 y colocar 50 ul del PBS Tween20 Ova 10% pH 7.4 en los pocillos A11 B11 A12 y B12 (Blanco de reacción). Incubar en cámara húmeda durante 1 hora, a 37° C .
11. Descartar el contenido de la placa. Lavar 4 veces. Secar.
12. En un tubo conteniendo 5000 ul de diluyente colocar la cantidad correspondiente de Anticuerpo Conjugado según su dilución de uso. Colocar 50 ul por pocillo en toda la placa. Incubar en cámara húmeda durante 1 hora, a 37° C .
13. Descartar el contenido de la placa. Lavar 5 veces. Secar.

Revelado, Lectura e Interpretación

14. Preparar 5 ml de solución de revelado. Colocar 50 ul de la solución de revelado en cada pocillo y esperar entre 10 y 15 minutos con la placa en oscuridad. Realizar una lectura de prueba a 405 nm para controlar que el control positivo está llegando a su valor de densidad óptica esperada de DOc de 0.470 mínimo.
15. Detener la reacción colocando 50 ul de solución de frenado (SDS 5%) en todos los pocillo de la placa y realizar la lectura. Pasar los datos de la lectura a una planilla de cálculo.
16. Realizar la resta de cada una de las absorbancias de las capturas positivas menos cada una de sus respectivas negativas. (Ejemplo: H1 menos G1= DOc (Densidades ópticas corregidas).
17. Calcular el promedio de las DOc del control positivo (100% PP).
18. Calcular el PP% de cada muestra en cada dilución $PP = \frac{DOc \text{ muestra}}{DOc \text{ Control Positivo}} * 100$. Calcular el promedio de las replicas del control negativo y su PP%.

ACEPTACIÓN DEL ENSAYO (CONFORMIDAD)

Los criterios que a continuación se describen se aplicarán individualmente a cada placa.

- Una placa de ensayo se considera conforme cuando el la DOc del control positivo se encuentra dentro del rango establecido DOc: **0.520 -0.960**. El control negativo y el blanco de reactivos presentan PP% menores al cut-off del ensayo (40%PP). El título del suero de referencia positivo da el valor esperado +/- una dilución base 4 (error del método).
- El título de Anticuerpos de una muestra se establece como la inversa de la máxima dilución cuya PP% sea mayor o igual al Cut-off del ensayo (40%PP).

INFORME DE RESULTADOS DE CALIDAD INMUNOGENICA DE VACUNAS DE IBR PROBADAS EN COBAYOS Y SUEROS EVALUADOS POR ELISA

Los resultados pueden interpretarse y utilizarse para clasificar una vacuna en el modelo cobayo por ELISA siempre que se haya dado conformidad al ensayo de ELISA y se cuente con un mínimo de 5 animales con resultado para realizar el título promedio de Ac inducido por la vacuna.

Para declarar al ensayo de inmunización conforme, los sueros de los cobayos inmunizados con la vacuna de referencia deben arrojar un título promedio dentro del rango establecido determinado por una carta de control que arroja el valor promedio \pm dos desvíos estándar obtenido de un mínimo de 5 pruebas.

Para la vacuna a evaluar se informa el título promedio de Ac anti-BoHV-1 detectado por ELISA como promedio de los títulos de los 5 animales (log en base 10 de la inversa de la máxima dilución cuyo porcentaje de positividad es mayor o igual al punto de corte del ensayo, establecido como mayor o igual al 40% del control positivo). Las muestras negativas en la mínima dilución de suero ensayada (1/40) se expresan con un título arbitrario de 0.3 para los cálculos.

ENSAYO DE NEUTRALIZACIÓN VIRAL PARA DETERMINAR AC PARA IBR

REACTIVOS

Virus de trabajo: BoHV-1 Cepa de Referencia Los Angeles (LA) o cepa de virus BoHV-1 autóctonos. Diluida de tal manera de contener 100 dosis infecciosas cultivo de tejido 50% (DICT₅₀).

Controles:

Control positivo cobayo: Pool de sueros de 5 cobayos vacunados con dos dosis de vacuna conteniendo 10⁷ DICT₅₀/ml de BoHV-1 en adyuvante oleoso (Vacuna de Referencia) con un título de Ac neutralizantes de 2.4-3.0.

Control negativo cobayo: Pool de sueros normales de cobayo (sueros de cobayos pre-inmunización o testigos no vacunados).

Estándar positivo: Suero de cobayo inmunizado, con título de Ac VN conocido.

Estándar negativo: Suero normal de cobayo.

Suspensión celular: Se utiliza una suspensión celular de la línea MDBK conteniendo 200.000-250.000 cel/ml

Inactivación de las muestras: Previo a su utilización en el ensayo de VN, las muestras de suero, incluidos los controles del ensayo deben ser sometidas a baño de agua a $56 \pm 3^\circ \text{C}$, durante 30 ± 5 minutos, para inactivar el complemento.

Preparación del medio de trabajo: MEM-E suplementado con 1% de solución antibiótica (0.5% sulfato de gentamicina, 0.7% sulfato de estreptomina, 0.2% penicilina G sódica) y 2% de suero fetal bovino (SFB).

PROCEDIMIENTO ENSAYO DE NEUTRALIZACIÓN VIRAL A VIRUS FIJO-SUERO VARIABLE:

1-Se utilizan placas de cultivo de 96 pocillos. Colocar 75 μ l/pocillo de medio en todas las placas a utilizar.

2-Diseño de la placa de los sueros problema: Agregar 25 μ l de la muestra problema, por cuadruplicado. Se comienza desde una dilución mínima de 1/4 que sumado al volumen de virus y células queda en una dilución inicial de 1/8. Incluir en forma aleatoria entre las muestras a analizar estándares de título conocido.

3-Diseño de la placa control: Se colocan los sueros control positivo y negativo del mismo modo que las muestras. Para realizar el control de células se colocan 150 μ l de medio de trabajo por cuadruplicado en cuatro filas (16 pocillos totales). Para el control de las 100 DICT₅₀ de virus, se realizan 3 diluciones en base 10 a partir de la dilución de trabajo. Se siembran 75 μ l por cuadruplicado de las 4 diluciones preparadas (Puro, 1/10; 1/100 y 1/1000) a las cuales se les agrega 75 μ l de medio.

4-Realizar diluciones seriadas en base 4, pasando 25 μ l, para todas las muestras y sueros controles.

5-Se realiza un control de toxicidad de cada muestra colocando 75 μ l de medio en otra placa.

6-Preparar la dilución de trabajo de virus (100 DICT₅₀) en el medio de trabajo. Colocar 75 μ l de la dilución de trabajo del virus en todas las placas, excepto en la placa de controles de toxicidad, en el control de células y en el control de 100 DICT₅₀.

7-Realizar tres diluciones base 10 del virus de trabajo (puro, 1/10; 1/100; 1/1000) sembrar 4 replicas de cada dilución en una placa aparte

8-Incubar las placas (mezcla suero-virus) durante 1 hora a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%.

9-Agregar sobre la mezcla suero-virus 100 μ l por pocillo, de la suspensión celular conteniendo 200.000-250.000 cel./ml en todas las placas. Incubar las placas a $37 \pm 1^\circ \text{C}$ en atmósfera de CO₂ al $5 \pm 1\%$, durante 48-72 hs.

Lectura e Interpretación

Al cabo de las 48-72 hs la lectura se realiza por inspección de las monocapas al microscopio óptico. La lectura es por observación de efecto citopático viral (CPE) característico de herpesvirus bovino. Se considera positivo aquel pocillo que presente un foco de CPE característico de BoHV-1. En los controles de toxicidad se debe observar la monocapa igual que los controles de células, libre de efecto CPE y libre de efecto toxico. El título neutralizante del suero analizado se obtiene según la cantidad de replicas protegidas en las diluciones seriadas en base al método de interpolación de Reed y Muench. Si un suero determinado presenta toxicidad en las diluciones analizadas, el título de anticuerpos neutralizantes no podrá determinarse por esta técnica.

ACEPTACIÓN DEL ENSAYO (CONFORMIDAD)

El ensayo se considera conforme cuando:

- Las monocapas de los controles de células se encuentran en buen estado (monocapas confluentes, células refringentes, sin alteraciones morfológicas, sin rastros de contaminación y sin CPE de BoHV-1).
- El título de la suspensión viral debe contener 100 DICT₅₀, con un rango admitido entre 50-200 DICT₅₀.
- El control positivo debe dar el título esperado ± 1 pocillo.
- El control negativo debe dar negativo. Se le coloca un valor arbitrario de **0.3** para los cálculos.

INFORME DE RESULTADOS DE CALIDAD INMUNOGENICA DE VACUNAS DE IBR PROBADAS EN COBAYOS Y SUEROS EVALUADOS POR VN

Los resultados pueden interpretarse y utilizarse para clasificar una vacuna en el modelo cobayo por VN siempre que se haya dado conformidad al ensayo de neutralización viral y se cuente con un mínimo de 5 animales con resultado para realizar el título promedio de Ac inducido por la vacuna.

Para validar el ensayo los sueros de los cobayos inmunizados con la vacuna de referencia deben arrojar un título promedio dentro del rango establecido determinado por una carta de control que arroja el valor promedio \pm dos desvíos estándar obtenido de un mínimo de 5 pruebas.

Para la vacuna a evaluar, se informa el título promedio de Ac neutralizantes anti-BoHV-1 obtenido según el método de Reed y Muench de los 5 cobayos inmunizados. Las muestras negativas en la mínima dilución de suero ensayada (1/8) se expresan con un título arbitrario de 0.3 para los cálculos.