

16 de março de 2012

C A M E V E T

Cod: 000

TRAMITAÇÃO II

DATA: Setembro 27 de 2013

PROTOCOLO DE PROVA DE POTÊNCIA PARA VACINAS
BOVINAS QUE CONTENHAM HERPES VÍRUS BOVINO
(BoHV-1) AGENTE CAUSAL DA RINOTRAQUEITE
INFECCIOSA BOVINA (IBR)



Protocolo nº 1 - G.B.

AUTORES

Participaram na confecção do protocolo as instituições representadas pelas seguintes pessoas (listadas em ordem alfabética), que formam o grupo ad hoc de vacinas virais combinadas bovinas da Fundação PROSAIA:

- **Dr. Enrique Argento** (Câmara Argentina da Indústria de Produtos Veterinários - CAPROVE).
- **Dra. Virginia Barros** (Analista Profissional no Departamento de Controle de Vacinas da Coordenação de Virologia. Direção de Laboratório Animal. Direção Geral de Laboratório e 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, 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 do CONICET)
- **Dra. María Marta Vena** (Médica veterinária. Consultora independente de pesquisa e desenvolvimento e assuntos regulatórios).

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

Tabela de conteúdos

1. Introdução	4
2. Controle de Potência em Cobaias: Objetivos e Alcance	5
Antecedentes do modelo cobaia	6
Critério de validação da prova em cobaias	8
Critério de aprovação da vacina segundo a prova cobaia.....	9
Harmonização de ensaios para a região	9
3. Referências	10
Anexo I.....	12

POTÊNCIA para vacinas inativadas bovinas que contenham
herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) agente causal da
Rinotraqueite Infecciosa Bovina (IBR)

1. INTRODUÇÃO

O herpesvírus bovino 1 (BoHV-1), agente etiológico da rinotraqueite infecciosa bovina/vulvovaginite postular infecciosa (RIB/VPI), doença do gado bovino doméstico e selvagem que provoca um amplo leque de manifestações clínicas que incluem, rinotraqueite, vulvovaginite, balanopostite postular infecciosa, conjuntivite, aborto, enterite e encefalite (1, 2, 3).

Na infecção respiratória e genital, o vírus se estabelece de forma latente nos gânglios nervoso. O estresse podem induzir a reativação da infecção latente e o vírus pode excretar-se de modo intermitente (1, 3).

A infecção induz uma resposta de anticorpos e uma resposta imune celular em 7 a 10 dias. Os anticorpos neutralizantes podem persistir até 5 anos depois da infecção, mas são necessárias reestimulações (reativação ou vacinação) para manter seus títulos a níveis detectáveis pela técnica de neutralização viral. Pelo contrário, os anticorpos totais, avaliados pelo ELISA, permanecem detectáveis durante a vida toda (24).

Em termos gerais, as vacinas evitam a manifestação de sintomas clínicos graves e reduzem a liberação do vírus depois da infecção, mas não evitam a infecção (1,2). Em vários países da Europa estão sendo realizadas campanhas de erradicação com ou sem vacinação (obrigatórias e/ou voluntárias). Noruega, Finlândia, Suécia, Áustria, Dinamarca, Suíça e algumas regiões da Itália e Alemanha da infecção foi eliminada (1,7). No resto do mundo a infecção é endêmica e com prevalências elevadas (8, 9, 10, 11).

Na atualidade há várias vacinas com BoHV-1 atenuado e inativado na região. Na Argentina e Uruguai as únicas vacinas admitidas pelas autoridades regulatórias são de vírus inativados. As vacinas contém cepas do vírus que geralmente tem se multiplicado durante múltiplas passagens em cultivo celular. As vacinas inativadas contém altos níveis de vírus inativados ou porções das partículas víricas (glicoproteínas) suplementadas com um adjuvante para estimular uma resposta imune adequada. As vacinas inativadas são administradas por via intramuscular ou subcutânea. Em vários países existem vacinas marcadoras ou DIVA (que permitem a diferenciação entre animais infectados e vacinados). Estas vacinas marcadoras tem base em mutantes selecionados ou em uma subunidade dos viriões, por exemplo, a glicoproteína E (12). Este tipo de vacinas é utilizado na Europa, nos países que aplicam programas de erradicação com campanhas de vacinação (1,7). Nos

países endêmicos, os programas de vacinação intensiva podem reduzir a prevalência dos animais infectados. (1).

Os organismos de controle internacional (APHIS, USA; EMEA-CVMP, UE; OIE; VICH) (1, 2, 13, 14) exigem para a aprovação de vacinas que contêm IBR ensaios de potência e eficácia na espécie de aplicação, que implicam a vacinação e desafio de bovinos susceptíveis e soronegativos. Uma vez aprovado o produto, agências como o CVB, USDA dos Estados Unidos da América, permitem a realização de ensaios *in vitro* para controlar a potência de vacinas virais aplicando o método de retas paralelas em comparação com uma vacina de referência [Title 9, Code of Federal Regulations (9 CFR) 113.8(a)(3)(ii)]. Nas vacinas inativadas o controle de cada série a liberar deve realizar-se através de uma prova de potência que determine a imunogenicidade do produto em bovinos ou em outro modelo animal de laboratório (*prova in vivo*) que tenha sido estatisticamente validado e possua um grau de concordância aceitável respeito à prova de potência na espécie de destino. Também é altamente desejável que este modelo seja validado como ferramenta preditiva do grau de proteção que conferirá a vacina perante a descarga viral em bovinos soronegativos (1, 2, 13, 14). A dificuldade de contar com bovinos soronegativos e o elevado custo das provas de imunogenicidade no hospedeiro natural, não permite realizar de forma rotineira esta prova de potência e eficácia na espécie alvo. Portanto, na Argentina foi decidido desenvolver e validar uma prova padronizada em animais de laboratório (cobaias) que permita avaliar a potência de cada lote de vacina, garantindo assim a presença no mercado de produtos padronizados.

Com relação ao bem-estar animal, os organismos internacionais fomentam o desenvolvimento de provas *in vitro*, para evitar ou reduzir ao mínimo o uso de animais em provas experimentais de controle (15, 16). No caso particular destas vacinas, simples ou combinadas e inativadas, a aplicação destas técnicas é possível e merece sua exploração, mas sendo que apresentam o inconveniente de que deveriam ser padronizadas para cada formulação em particular (conjunto de antígenos inativados e adjuvantes, vacinas a sub unidades e vacinas a DNA), ainda se considera inevitável passar por uma prova *in vivo* para avaliar a Potência destes produtos (17).

2. CONTROLE DE POTÊNCIA EM COBAIAS: OBJETIVOS E ALCANCE

No modelo cobaia desenvolvido, se bem se trata de um experimento *in vivo*, o número de animais a utilizar (n=6 por vacina e 4 testemunhas/placebos) e a quantidade de extrações de sangue se reduz ao mínimo. As cobaias apresentam a vantagem perante outros animais de laboratório, como ratos, que por seu maior tamanho permite que se possam tomar amostras seriadas de soro, sem comprometer a vida do animal. Além disso, com o volume de amostra obtida é possível avaliar a qualidade das vacinas polivalentes para todos os antígenos virais que a compõem; as que, em alguns casos, chegam a conter até 4 valências destes 5 agentes: herpesvírus bovino, vírus da diarreia viral bovina, vírus respiratório sincicial, vírus de parainfluenza 3, rotavírus bovino. Algumas vacinas para

prevenir as diarreias neonatais do bezerro também incluem coronavírus bovino na sua formulação.

Finalmente, a avaliação sorológica é independente do tipo de adjuvante (oleoso ou aquoso) e da quantidade e qualidade dos vírus inativados que compõem a formulação.

Antecedentes do modelo de cobaia

O experimento de teste de vacinas virais em cobaias é baseado na imunização de 6 cobaias com duas doses de vacina (em intervalo de 21 dias), por via subcutânea, de um volume correspondente a 1/5 da dose bovina. Os animais se mantêm sob estudo durante um mínimo de 30 dias e são colhidas amostras de soro no momento da primeira dose de vacina (0 dias pós-vacinação) e 9 dias pós-revacinação. Junto com a avaliação da/s vacina/s incógnitas (n=6), são incluídos dois grupos de cobaias, um vacinado com uma *vacina de referência* de potência conhecida (n=6) e um grupo de animais testemunhas não vacinados (n=4). A trinta (30) dias de iniciado o controle os animais vacinados são sangrados, realizando neles o controle sorológico através de ELISA e neutralização viral. É importante salientar que as cobaias são uma espécie livre de BoHV-1 e, portanto, naturalmente soronegativos para anticorpos (Ac) contra este agente viral.

A partir dos resultados obtidos desde 2008, onde todos os soros das cobaias obtidos no começo da prova foram negativos, podemos recomendar o controle anual dos animais reprodutores da colônia, suprimindo assim as amostras iniciais dos animais, colhendo apenas amostras no fim da prova (30 dpv) nos grupos vacinados e testemunhas.

A validação do modelo cobaia para a valência IBR, a partir da análise de regressão linear do título de Ac determinado pelo ELISA e neutralização viral (VN), indicou que a resposta de anticorpos induzida pelas vacinas de BoHV-1 em bovinos e cobaias foi diretamente proporcional à concentração de antígeno (Ag) contido na vacina (ensaio dose-resposta). O modelo cobaia foi capaz de discriminar significativamente entre vacinas formuladas com concentrações de Ag de 1 log de diferença, tanto pelo ELISA como pelo VN. A partir dos resultados obtidos na curva dose-resposta, foram calculados pontos de corte ou níveis de títulos de Ac anti-BoHV-1 que permitem diferenciar as vacinas segundo a imunogenicidade induzida em cobaias e bovinos. Foram estabelecidos dois pontos de corte e três categorias pelo ensaio ELISA (Tabela 1) e VN (Tabela 2). Finalmente, vacinas representativas de cada categoria foram avaliadas em uma prova de desafio experimental com IBR em bovinos soronegativos e se estabeleceu a relação do título de Ac em cobaias e bovinos e o grau de proteção perante a infecção (18).

ESPÉCIE	POTÊNCIA DA VACINA ELISA		
	NÃO SATISFATÓRIA	SATISFATÓRIA	MUITO SATISFATÓRIA
COBAIA	$\bar{y} < 1.93$	$1.93 \leq \bar{y} < 3.02$	$3.02 \leq \bar{y}$
BOVINO	$\bar{Y} < 1.69$	$1.69 \leq \bar{Y} < 2.72$	$2.72 \leq \bar{Y}$

Tabela 1. Pontos de corte determinados pelo ELISA expostos como o log10 da inversa da diluição de soro analisado que resulta positiva no ensaio. Título médio de Ac de grupos de 5 cobaias, avaliado a 30 dias pós vacinação (dpv) e grupos de 5 bovinos soronegativos avaliados a 60 dpv. Os bovinos recebem duas doses de vacina com um intervalo de 30 dias segundo o que recomendam os laboratórios produtores e se colhem amostras a 0 e 60 dpv, dado que este ponto representa o cume ou *plateau* da resposta de Ac contra BoHV-1. As cobaias recebem duas doses de vacina (1/5 do volume da dose bovina) com um intervalo de 21 dias e se colhem amostras a 0-30 dpv. O protocolo de vacinação aplicado nas cobaias permite obter uma cinética de resposta de Ac similar à da espécie de destino, mas se reduzem os tempos em 30 dias, resultando em uma prova mais rápida e econômica que a prova em bovinos.

Títulos de Ac determinados pelo ELISA maiores a 3.02 em cobaias e 2.72 em bovinos se associaram a vacinas de potência muito satisfatórias. Vacinas que induziram títulos de Ac entre 3.02 -1.93 em cobaias e 2.72-1.69 em bovinos resultaram satisfatórias (18). Por sua vez, as vacinas que induzem títulos de Ac inferiores a 1.93 em cobaias e 1.69 em bovinos se consideram insatisfatórias para sua comercialização.

ESPÉCIE	POTÊNCIA DA VACINA neutralização viral (VN)		
	NÃO SATISFATÓRIA	SATISFATÓRIA	MUITO SATISFATÓRIA
COBAIA	$\bar{y} < 1.31$	$1.31 \leq \bar{y} < 2.05$	$2.05 \leq \bar{y}$
BOVINO	$\bar{Y} < 1.27$	$1.27 \leq \bar{Y} < 1.96$	$1.96 \leq \bar{Y}$

Tabela 2. Pontos de corte determinados por VN, expostos como títulos de Ac neutralizantes calculados pelo método de Reed e Muench. Título médio de Ac de grupos de 5 cobaias, avaliado a 30 dias pós vacinação (dpv) e grupos de 5 bovinos soronegativos avaliados a 60 dpv. Os bovinos recebem duas doses de vacina com um intervalo de 30 dias e se colhem amostras a 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 colhem amostras a 0-30 dpv.

Títulos de Ac neutralizantes por cima de 2.05 em cobaias e 1.96 em bovinos foram associados a vacinas de potência muito satisfatórias. Vacinas que induziram títulos de Ac entre 2.05-1.31 em cobaias e 1.96-1.27 em bovinos resultaram satisfatórias. No entanto, vacinas que induzem títulos de Ac inferiores a 1.31 em cobaias e 1.27 em bovinos são consideradas insatisfatórias, e por conseguinte, não aptas para sua comercialização.

Tanto pelo ELISA como por VN, as vacinas classificadas como muito satisfatórias ou satisfatórias cumprem os requisitos exigidos pelo 9.CFR, USA e o manual de diagnóstico e vacinas dos animais terrestres da OIE para sua aprovação. Com relação à proteção perante à infecção é exigida uma redução de 1/100 ou maior do título de vírus infeccioso excretado nos animais vacinados respeito ao título excretado pelos controles não vacinados. No ensaio de desafio efetuado com vacinas representativas das categorias muito satisfatória e satisfatória, nos animais vacinados com ambas as vacinas se reduz significativamente a quantidade de vírus excretado respeito ao controle. Por sua vez, o vírus excretado por animais vacinados com a vacina muito satisfatória foi significativamente menor ao excretado pelo grupo que recebeu a vacina satisfatória. Com relação à duração dos sinais clínicos, a OIE exige uma redução dos mesmos de pelo menos três dias ou mais, respeito à duração da doença dos controles. Este requisito apenas foi atingido pela vacina muito satisfatória. Apesar disso, quando se utilizam medições mais apropriadas para avaliar a doença, como a área sob a curva que contempla o grau de severidade e a duração do quadro clínico, ambas as categorias de vacinas reduzem significativamente os sinais de doença (18).

A partir deste critério, para avaliar o grau de concordância entre o modelo cobaia e os bovinos foram realizadas 63 provas em paralelo em ambas as espécies que incluíram as vacinas de calibração utilizadas no ensaio dose-resposta, grupos inoculados com placebos, grupos não vacinados e 22 vacinas comerciais de qualidade desconhecida e se obteve como cálculo da concordância um índice kappa (K) =0.894; ASE = 0.041; 95% CI 0.813–0.974; $p < 0.0001$, para Ac determinados pelo ELISA e K=0.876, ASE = 0.050; 95%CI 0.777–0.971; $p < 0.0001$, para Ac neutralizantes, o que indica uma concordância muito boa entre a potência calculada pelo modelo cobaia e a obtida na espécie destino (19).

O modelo cobaia conseguiu predizer adequadamente não só a qualidade imunogênica das vacinas, mas também seu grau de eficácia perante o desafio experimental em bovinos. A prova proposta não precisa infraestrutura nem tecnologia complexas, apenas um biotério com cobaias e técnicas sorológicas correntes (ELISA, VN) de uso rotineiro nos laboratórios de virologia, corretamente harmonizadas com normas internacionais (9.CFR, OIE, EMEA) e preferentemente validadas sob normas ISO-IEC 17025 (20, 21, 22, 23).

Critério de validação da prova em cobaias

A prova de potência em cobaias se considera válida quando a média obtida do título de Ac dos animais vacinados com uma vacina de referência resulta no valor esperado (24), e os animais controles não vacinados (testemunhas) permanecem soronegativos para Ac contra BoHV-1 durante toda a experiência.

Critério de aprovação da vacina segundo a prova de potência em cobaia

a) ELISA

Serão avaliados todos os soros dos animais imunizados com a vacina controlada. Selecionar-se-ão CINCO (5) dos soros com maior título obtido e sobre eles se realizará a média. Para a **APROVAÇÃO** da vacina submetida a controle, a média dos títulos de Ac a 30 dpv deverá ser maior ou igual a **1.93** pela técnica de ELISA para BoHV-1.

b) NEUTRALIZAÇÃO VIRAL

Serão avaliados todos os soros dos animais imunizados com a vacina submetida a controle. Selecionar-se-ão CINCO (5) dos soros com maior título obtido e sobre eles se realizará a média. Para a **APROVAÇÃO** da vacina submetida a controle, a média dos títulos de Ac a 30 dpv deverá ser maior ou igual a **1.31** pela técnica de VN para BoHV-1.

Harmonização de ensaios para a região

Será elaborado um painel de soros controles positivos e negativos, bem como vacinas de referência, que estarão à disposição dos usuários da região para harmonizar os resultados obtidos por cada laboratório de ensaios que adotar este método de controle.

Os soros de referência locais (de cobaias e bovinos) terão rastreabilidade nas técnicas descritas contra os soros bovinos de referência europeus (EU1, EU2 e EU3) fornecidos pelos laboratórios de referência da OIE.

3.- REFERÊNCIAS

- 1- OIE. Chapter 2.4.13. Infectious Bovine Rhinotracheitis/Infectious Postular 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; Compaired 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

AO PROTOCOLO DE PROVA DE POTÊNCIA E EFICÁCIA PARA VACINAS BOVINAS QUE CONTENHAM NA SUA FORMULAÇÃO HERPES VÍRUS BOVINO (BOHV-1) AGENTE CAUSAL DA RINOTRAQUEITE INFECCIOSA BOVINA (IBR)

PROCEDIMENTO

PROVA DE POTÊNCIA PARA IBR EM COBAIAS

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

Quarentena de animais. Os animais terão um prazo mínimo de adaptação depois de ingressar à sala de inoculação de SETE (7) dias.

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

Extração de sangue para obtenção de amostras de soro. Pode ser realizada por punção cardíaca, veia jugular ou a veia da orelha.

CONTROLES SOROLÓGICOS PARA A PROVA DE POTÊNCIA EM COBAIAS

ENSAIO DE ELISA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA IBR

É utilizado um ELISA indireto validado para a detecção de anticorpos anti-BoHV-1. (20). Brevemente, sensibilizam-se placas com vírus BoHV-1 obtido a partir de células MDBK infectadas (recipiente positivo), ou células MDBK como controle negativo de infecção (recipiente negativo). A concentração ótima de vírus e células não infectadas para sensibilizar as placas se determina por titulação cruzada para cada lote produzido e é constante para toda a placa. Os soros se ensaiam em ambos os recipientes (+ e -) em 6 diluições seriadas base 4 começando desde uma diluição mínima de 1/40. O ensaio se revela utilizando como anticorpo detector um Ac anti IgG(H+L) de cobaia marcado com peroxidase. Como sistema substrato cromógeno se utiliza H₂O₂/ABTS e a leitura se realiza em um leitor de ELISA a 405 nm.

REAGENTES

- **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 Monoidrato 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) ou HCl 1N.
Armazenar a 4º C (1-8º C).

- **ABTS Solução Mãe**

ABTS 0,22 grs.
Buffer Ácido Cítrico 10 ml.
Fracionar em alíquotas 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 para frear:** SDS (dodecil/lauril sulfato de sódio) a 5% em água. Armazenar a temperatura ambiente.

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

PBS pH 7.4 1000 ml
Tween₂₀ 500 µL

- **Buffer de bloqueio e diluente.** PBS/Tween20 0.05%/OVA 1%, pH 7.4

Tween₂₀ 500ul.
PBS 1X 1000 ml.
Ovoalbúmina 10 gramas.
Fracionar em alíquotas de 50 ml em tubos plásticos. Armazenar a -20 ± 5º C.

REAGENTES PARA SENSIBILIZAÇÃO

Controle de Captura Positivo Antígeno: Preparado a partir de culturas de células MDBK infectadas com cepas de BHV-1 de referência.

Controle de Captura Negativo: Preparado a partir de culturas de células MDBK.

Anticorpo detector CONJUGADO

Conjugado Anti IgG de Cobaia marcado com peroxidase. Podem 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

Obs.: Conjugados de outras marcas ou conjugados produzidos internamente previamente verificados/validados como ótimos para serem utilizados no ensaio de ELISA podem utilizar-se depois da titulação correspondente perante soros de referência.

CONTROLES

Controle positivo cobaia: Pool de soros de 5 cobaias vacinadas com duas doses de vacina contendo 10^7 DICT₅₀/ml de BoHV-1 em adjuvante oleoso (Vacina de Referência).

Considerar-se-ão conformes aqueles ensaios nos quais o controle positivo esteja dentro do valor médio ± 1 desvio padrão (SD)

Valor médio ± 1 SD = $0.520 \leq 0.740 \leq 0.960$
--

Dito soro, analisado por soroneutralização deve apresentar um título de anticorpos neutralizantes contra BoHV-1 entre 2.4 e 3.0 (Título apresentado segundo o método de Reed e Muench).

Controle negativo cobaia: Soro de cobaia cuja absorvância corrigida na diluição de uso resultar menor ao ponto de corte (cut off) da técnica (40% da absorvância corrigida do controle positivo).

Branco de Reagentes: PBS.

Para cada um dos controles se utilizam 4 recipientes (duas capturas positivas e as duas capturas negativas correspondentes). Recomenda-se incluir também, em cada ensaio uma amostra positiva de título conhecido e outra amostra negativa (soros padrões internos). Estas amostras são semeadas aleatoriamente em diferentes lugares em pelo menos duas das placas do ensaio e se correm em todos os ensaios.

PROCEDIMENTO DO ELISA:

Sensibilização de placas

1. Realizar a diluição de uso do Antígeno e o controle de captura negativo em Buffer de sensibilização de placas, pH 9.6. Utilizar placas de ELISA de 96 recipientes “tipo immulon 1b”. Colocar 50 μ l do antígeno nas filas B-D-F-H e 50 μ l de captura negativa nas filas A-C-E-G. Incubar durante 17 horas ± 2 hs, entre 4 $^{\circ}$ C e 8 $^{\circ}$ C.

2. Descartar o conteúdo da placa. Lavar 3 vezes com buffer de lavagem (PBS/Tween₂₀ 0,05 %, pH 7,4)
3. Adicionar 100 ul /recipiente de Buffer de bloqueio (PBS Tween₂₀ 0,05%/OVA 10%, pH 7.4). Incubar em câmara úmida durante 1 hora, a 37º C.
4. A continuação descartar o bloqueio, lavar 3 vezes e se pode proceder com o ensaio ou guardar a placa a -20°C, durante um máximo de 30 dias.

Diluição e sementeado de amostras

5. Para a diluição das amostras se recomenda o uso de placas de cultivo de 96 recipientes. Colocar 195 ul de buffer de bloqueio na coluna 1 e 7 e 150 ul nas colunas restantes.
6. Adicionar 5 ul dos soros a analisar e colocá-los em pares de recipientes 1:AB, 1CD, 1EF, 1GH, 7CD, 7EF, 7 GH (diluição inicial de soro 1/40). Entram 7 amostras por placa. Os recipientes 7-12 AB se destinam aos controles do ensaio.
7. Realizar diluições base 4, transferindo 50 ul de 1-6, descartar os tips. Com novos tips realizar as diluições de 7-12.
8. Transferir 50 ul de cada diluição realizada à placa de reação desde a diluição mais diluída até a mais concentrada.

Diluição e sementeado de controles

9. O kit de ELISA será fornecido com controles padronizados que deverão preparar-se da seguinte forma: Colocar em dois tubo, 200 ul de diluente (PBS Tween₂₀ Ova 10% pH 7.4), e 4ul de Soro Controle Positivo e Soro Controle Negativo, respectivamente. Homogeneizar.
10. Colocar 50 ul da diluição do Controle Positivo nos recipientes A7 B7 A8 e B8 e 50 ul da diluição do Controle Negativo nos recipientes A9 B9 A10 e B10 e colocar 50 ul do PBS Tween₂₀ Ova 10% pH 7.4 nos recipientes A11 B11 A12 e B12. Incubar em câmara úmida durante 1 hora, a 37º C .
11. Descartar o conteúdo da placa. Lavar 4 vezes. Secar.
12. Em um tubo contendo 5000 ul de diluente colocar a quantidade correspondente de Anticorpo Conjugado segundo sua diluição de uso. Colocar 50 ul por recipiente em toda a placa. Incubar em câmara úmida durante 1 hora, a 37º C .
13. Descartar o conteúdo da placa. Lavar 5 vezes. Secar.

Revelado, Leitura e Interpretação

14. Preparar 5 ml de solução de revelado. Colocar 50 ul da solução de revelado em cada recipiente e esperar entre 10 e 15 minutos com a placa na escuridão. Realizar uma leitura de prova a 405 nm para controlar que o controle positivo esteja chegando a seu valor de densidade ótica esperada de DOc de 0.470 mínimo.

15. Deter a reação colocando 50 ul de solução de freado (SDS 5%) em todos os recipientes da placa e realizar a leitura. Passar os dados da leitura a uma planilha de cálculo.
16. Realizar a subtração de cada uma das absorbâncias das capturas positivas menos cada uma de suas respectivas negativas. (Exemplo: H1 menos G1= DOc (Densidades óticas corrigidas).
17. Calcular a média das DOc do controle positivo (100% PP).
18. Calcular o PP% de cada amostra em cada diluição $PP = \frac{DOc \text{ amostra}}{DOc \text{ Controle Positivo}} * 100$. Calcular a média das réplicas do controle negativo e seu PP%.

ACEITAÇÃO DO ENSAIO (CONFORMIDADE)

Os critérios descritos a seguir aplicar-se-ão individualmente a cada placa.

- Uma placa de ensaio se considera conforme quando o DOc do controle positivo se encontra dentro do nível estabelecido DOc: **0.520 -0.960**. O controle negativo e o branco de reagentes apresentam PP% menores ao *cut-off* do ensaio (40%PP). O título do soro de referência positivo dá o valor esperado +/- uma diluição base 4 (erro do método).
- O título de Anticorpos de uma amostra se estabelece como a inversa da máxima diluição cuja PP% seja maior ou igual ao *Cut-off* do ensaio (40%PP).

RELATÓRIO DE RESULTADOS DE QUALIDADE IMUNOGÊNICA DE VACINAS DE IBR PROVADAS EM COBAIAS E SOROS AVALIADOS PELO ELISA

Os resultados podem interpretar-se e utilizar-se para classificar uma vacina no modelo cobaia pelo ELISA desde que se tenha prestado conformidade ao ensaio de ELISA e se conte com um mínimo de 5 animais com resultados para realizar o título médio de Ac induzido pela vacina.

Para validar o ensaio os soros das cobaias imunizadas com a vacina de referência devem apresentar um título médio dentro do nível estabelecido determinado por uma carta de controle que apresente o valor médio \pm dois desvios padrões obtido de um mínimo de 5 provas.

Para a vacina a ser avaliada se reportará o título médio de Ac anti-BoHV-1 detectado pelo ELISA como média dos títulos dos 5 animais (log com base 10 da inversa da máxima diluição cuja percentagem de positividade seja maior ou igual ao ponto de corte do ensaio, estabelecido como maior ou igual a 40% do controle positivo). As amostras

negativas na mínima diluição de soro ensaiada (1/40) se expressam –para fins de cálculo– com um título arbitrário de 0.3.

ENSAIO DE NEUTRALIZAÇÃO VIRAL PARA DETERMINAR AC PARA IBR

REAGENTES

Vírus de trabalho: BoHV-1 Cepa de Referência Los Angeles (LA) ou cepa de vírus BoHV-1 autotonos. Diluída de tal forma de conter 100 doses infecciosas cultura de tecido 50% (DICT₅₀).

Controles:

Controle positivo cobaia: Pool de soros de 5 cobaias vacinadas com duas doses de vacina contendo 10⁷ DICT₅₀/ml de BoHV-1 em adjuvante oleoso (Vacina de Referência) com um título de Ac neutralizantes de 2.4-3.0.

Controle negativo cobaia: Pool de soros normais de cobaia (soros de cobaias pré-imunização ou testemunhas não vacinadas).

Padrão positivo: Soro de cobaia imunizada, com título de Ac VN conhecido.

Padrão negativo: Soro normal de cobaia.

Suspensão celular: É utilizada uma suspensão celular da linha MDBK contendo 200.000-250.000 cel/ml

Inativação das amostras: Prévio à sua utilização no ensaio de VN, as amostras de soro, incluídos os controles do ensaio, devem ser submetidas a banho d'água a 56 ± 3º C, durante 30 ± 5 minutos, para inativar o complemento.

Preparação do meio de trabalho: MEM-E suplementado com 1% de solução antibiótica (0.5% sulfato de gentamicina, 0.7% sulfato de estreptomicina, 0.2% penicilina G sódica) e 2% de soro fetal bovino (SFB).

PROCEDIMENTO DO ENSAIO DE NEUTRALIZAÇÃO VIRAL A VÍRUS FIXO-SORO VARIÁVEL:

1. São utilizadas placas de cultura de 96 recipientes. Colocar 75µl/recipientes de meio em todas as placas a utilizar.
2. **Desenho da placa dos soros problema:** Adicionar 25µl da amostra problema, por quadruplicado. Começa-se a partir de uma diluição mínima de 1/4 que somado ao volume de vírus e células fica em uma diluição inicial de 1/8. Incluir de forma aleatória entre as amostras a analisar padrões de título conhecido.
3. **Desenho da placa controle:** Os soros controle positivo e negativo colocam-se do mesmo modo que as amostras. Para realizar o controle de células se colocam 150µl de meio de trabalho por quadruplicado em quatro filas (16 recipientes totais). Para o controle das 100 DICT₅₀ de vírus, realizam-se 3 diluições com base 10 a partir da

- diluição de trabalho. São semeadas 75µl por quadruplicado das 4 diluições preparadas (Puro, 1/10; 1/100 e 1/1000) às quais se adiciona 75µl de meio.
4. Realizar diluições seriadas com base 4, passando 25µl, para todas as amostras e soros controles.
 5. É realizado um controle de toxicidade de cada amostra colocando 75µl de meio em outra placa.
 6. Preparar a diluição de trabalho de vírus (100 DICT₅₀) no meio de trabalho. Colocar 75µl da diluição de trabalho do vírus em todas as placas, salvo na placa de controle de toxicidade, no controle de células e no controle de 100 DICT₅₀.
 7. Realizar três diluições base 10 do vírus de trabalho (puro, 1/10; 1/100; 1/1000) semear 4 réplicas de cada diluição em uma outra placa.
Incubar as placas (misturar soro- vírus) durante 1 hora a 37 ° C em atmosfera de CO₂ a 5%.
 8. Adicionar sobre a mistura soro-vírus 100µl em cada recipiente, da suspensão celular contendo 200.000-250.000 cel./ml em todas as placas. Incubar as placas a 37 ± 1° C em atmosfera de CO₂ a 5 ± 1 %, durante 48-72 hs.

Leitura e Interpretação

Passadas 48-72 hs a leitura se realiza através da inspeção das monocapas ao microscópio ótico. A leitura se realiza através da observação do efeito citopático viral (CPE) característico de herpesvírus bovino. Considera-se positivo aquele recipiente que apresentar um foco de CPE característico de BoHV-1. Nos controles de toxicidade se deve observar a monocapa igual que os controles de células, livre de efeito CPE e livre de efeito tóxico. O título neutralizante do soro analisado se obtém segundo a quantidade de réplicas protegidas nas diluições seriadas com base no método de interpolação de Reed e Muench. Se um soro determinado apresentar toxicidade nas diluições analisadas, o título de anticorpos neutralizantes não poderá determinar-se por esta técnica.

ACEITAÇÃO DO ENSAIO (CONFORMIDADE)

O ensaio se considera conforme quando:

- As monocapas dos controles de células estão em bom estado (monocapas confluentes, células refringentes, sem alterações morfológicas, sem marcas de contaminação e sem CPE de BoHV-1).
- O título da suspensão viral deve conter 100 DICT₅₀, com um nível admitido entre 50-200 DICT₅₀.
- O controle positivo deve dar o título esperado ± 1 recipiente.
- O controle negativo deve dar negativo. É colocado um valor arbitrário de **0.3** a fim de efetuar os cálculos.

RELATÓRIO DE RESULTADOS DE QUALIDADE IMUNOGÊNICA DE VACINAS DE IBR PROVADAS EM COBAIAS E SOROS AVALIADOS POR VN

Os resultados podem interpretar-se e utilizar-se para classificar uma vacina no modelo cobaia por VN desde que se tenha prestado conformidade ao ensaio de neutralização viral e se conte com um mínimo de 5 animais com resultado para realizar o título médio de Ac induzido pela vacina.

Para validar o ensaio os soros das cobaias imunizadas com a vacina de referência devem apresentar um título médio dentro do nível estabelecido determinado por uma carta de controle que apresente o valor médio \pm dois desvios padrão obtido de um mínimo de 5 provas.

Para a vacina a ser avaliada, comunica-se o título médio de Ac neutralizantes anti-BoHV-1 obtido segundo o método de Reed e Muench das 5 cobaias imunizadas. As amostras negativas na mínima diluição de soro ensaiada (1/8) se expressam com um título arbitrário de 0.3, para fins de cálculos.