

28 de septiembre del 2012
C A M E V E T
Cod: 000
TRÁMITE III
FECHA: 4 de Julio de 2013

GUÍA DE PRUEBA DE POTENCIA PARA VACUNAS
BOVINAS INACTIVADAS QUE CONTENGAN VIRUS
PARAINFLUENZA 3 BOVINO (PI-3)



Guía nº 2 - 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. Eliana Smitsaart** (Cámara Argentina de la Industria de Productos Veterinarios - CAPROVE).
- **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.....	3
2. Guía: Control de potencia en cobayos.....	5
2.1. Diseño de la prueba.....	5
2.1.1. Cobayos.....	5
2.1.2 Procedimiento.....	6
2.1.3. Interpretación.....	6
2.1.4. Criterio de validación de la prueba.....	7
2.1.5. Cálculos.....	7
2.1.6. Criterio de aprobación.....	7
3. Armonización de ensayos para la región.....	7
4. Referencias.....	9
Anexo I.....	11

PRUEBA DE POTENCIA PARA VACUNAS BOVINAS INACTIVADAS QUE CONTENGAN VIRUS DE PARAINFLUENZA 3 BOVINO (PI-3)

1. INTRODUCCION

El virus de Parainfluenza 3 bovino (PI-3), pertenece al género *Respirovirus* (Murphy et al., 1995) de la familia *Paramixoviridae*. Las partículas virales son pleomórficas (usualmente esféricas o filamentosas) de alrededor de 150 nm de diámetro y constan de una nucleocápside de simetría helicoidal, rodeada de una envoltura derivada de la membrana celular donde se expresan dos glicoproteínas de superficie: la hemoaglutinina-neuraminidasa (HN) y la proteína de fusión (F). Estas proteínas se consideran los principales antígenos virales y son responsables de inducir una respuesta de anticuerpos neutralizantes en los animales infectados (Robert M. Chanock, 2001). La hemoaglutinación, hemoadsorción, hemólisis y fusión celular son actividades biológicas asociadas a las proteínas de la envoltura viral.

El virus de PI-3 bovino ha sido reconocido extensamente por años como un agente causal de infección endémica del ganado bovino. Actualmente, se lo reconoce como un agente participante del complejo de enfermedades respiratorias del bovino pero su rol en la patogenia es de menor importancia que el del virus respiratorio sincitial bovino (VRSB). La presentación clínica de la infección por PI-3 puede ser muy variable desde infecciones asintomáticas hasta enfermedad respiratoria severa caracterizada por tos seca, fiebre y descarga nasal (Morein and Dinter, 1975). La presentación clínica se da principalmente en terneros con bajos niveles de anticuerpos pasivos y en animales sometidos a stress. La infección por PI-3 puede contribuir a un estado de inmunosupresión y lesión tisular que desemboca en una bronconeumonía severa generada por infecciones bacterianas secundarias (Haanes et al., 1997). PI-3 se reconoce como un agente importante de la neumonía enzoótica en terneros y como agente participante del complejo respiratorio de en bovinos de feedlot de EE.UU. y posiblemente a nivel mundial El virus de PI-3 fue aislado por primera vez de bovinos con síntomas respiratorios en EE UU. Actualmente la infección es endémica y presenta distribución mundial. La infección natural es, en general, asintomática o suele cursar con sintomatología leve. Sin embargo, la infección por PI-3 predispone al ganado a sufrir infecciones bacterianas secundarias como neumonía aguda por *Pasteurella sp.* o el síndrome conocido como “Fiebre del transporte” (del inglés shipping fever) (Ellis, 2010). En los países de la región, por ejemplo en Argentina, la infección por PI-3 fue detectada por evidencia serológica en la década del 80’ (Lager, 1983). Relevamientos serológicos realizados en la década del 2000 en rodeos bovinos no

vacunados de Jujuy y Neuquén indicaron que el 100% de los bovinos adultos resultaron seropositivos para anticuerpos contra este agente viral (Marcoppido et al., 2010 ; Robles, 2008).

En relación a su caracterización antigénica y genética, los virus PI-3 bovinos se clasifican actualmente en 3 genotipos: genotipo A distribuido principalmente en E.E. U.U. y Europa, genotipo B descrito hasta el momento únicamente en Australia y el genotipo C solo reportado en China (Zhu et al., 2011). En Argentina el virus se ha aislado de casos de enfermedad respiratoria de bovinos y de búfalos. Las cepas detectadas en bovinos se clasificaron dentro de los genotipos A y C, mientras que las cepas detectadas en búfalos correspondieron a un virus bovino perteneciente al genotipo B (Maidana et al., 2012).

Las Hemoaglutininas (HA) presentes en la superficie de este virus pueden ser bloqueadas en su función por la presencia de anticuerpos. Estos se dirigen contra los antígenos específicos responsables de la unión a glóbulos rojos. La Inhibición de la Hemoaglutinación (IHA) es una técnica rápida, económica y de fácil implementación en laboratorios de infraestructura básica para dosar estos anticuerpos (ANEXO I). Esta técnica serológica resulta una herramienta útil para relevar la presencia de animales infectados en un rodeo o para evaluar la respuesta inducida por una vacunación, dado que los animales expuestos al virus (post infección y/o vacunación) aumentan significativamente el título de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación (IHA). Para los agentes virales hemoaglutinantes de las familias virales orthomixoviridae y paramixoviridae el título de anticuerpos IHA en suero se asocian con protección a la infección (Beyer et al., 2004; de Jong et al., 2003; Lee et al., 2001). En el mercado existen numerosas vacunas polivalentes para prevenir el síndrome respiratorio del bovino que se formulan en adyuvante acuoso u oleoso con el virus PI-3 inactivado acompañado de otros antígenos virales (BoHV-1, BDVD y BRSV) y antígenos bacterianos. El umbral mínimo de anticuerpos calostrales que deben poseer los terneros para estar protegidos frente a la infección natural por PI-3 ha sido reportado como 1/32 (en nuestro método con un título en UIHA = $32 * 8 = 256$; expresado en $\log_{10} = 2.4$) (Ellis, 2010).

En nuestro conocimiento, en la región no hay un criterio unificado para evaluar la eficacia de las vacunas inactivadas que contienen PI-3 en su formulación.

2. GUÍA: CONTROL DE POTENCIA EN COBAYOS

Esta guía describe una prueba *in vivo* en animales de laboratorio (cobayos) que permite evaluar la potencia (inmunogenicidad) de vacunas utilizadas en la prevención del síndrome respiratorio bovino frente a PI-3.

Para la validación del modelo se siguieron las recomendaciones internacionales para validación de métodos de control de vacunas veterinarias, en particular vacunas combinadas (EMEA/P038/97, 1998; Taffs, 2001). Se evaluaron en paralelo en bovinos y cobayos vacunas experimentales y comerciales, formuladas en adyuvantes oleosos y acuosos, conteniendo la valencia PI-3, combinada con otros antígenos virales (IBR, BVDV, VRSB) y bacterianos (*Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica* e *Histophilus sommi*). La inmunogenicidad, medida en ambas especies como el título de anticuerpos IHA contra PI-3 post vacunación demostró altos índices de concordancia entre el modelo y la especie de destino (Parreño, 2010; Parreño, 2008). Los detalles técnicos y estadísticos de la validación se presentan en el ANEXO II de esta guía. Esta prueba puede utilizarse para el control de calidad de cada serie de vacuna de PI-3 a liberar al mercado, resulta una herramienta práctica tanto para las empresas productoras de vacunas como para el organismo de control oficial, garantizando así la presencia en el mercado de productos estandarizados y eficaces.

En relación al bienestar animal esta prueba responde a los lineamientos de los organismos internacionales al reemplazar y reducir significativamente el uso de animales en pruebas experimentales (Akkermans and Hendriksen, 1999; Halder et al., 2002; Hendriksen, 2009).

El modelo cobayo desarrollado es un ensayo *in vivo*, con un número limitado pero suficiente de animales (n=6 por vacuna y 4 testigos/placebos) que facilita el desarrollo experimental (Akkermans and Hendriksen, 1999). Además permite evaluar en vacunas combinadas polivalentes la inmunogenicidad inducida para todos los antígenos virales que la componen.

2.1 Diseño de la prueba

2.1.1 Cobayos

Se utilizan como mínimo 6 animales por cada vacuna, mayores de 30 días de edad y con un peso de 400 gramos \pm 50 gramos. Pueden utilizarse machos o hembras pero cada grupo debe contener animales del mismo sexo, con un plazo de adaptación después del ingreso a la sala de inoculación de SIETE (7) días como mínimo. Luego de este período y antes de iniciar la inmunización se recomienda la toma de muestras de suero para descartar

la presencia de Ac IHA anti-PI-3. En caso de que los animales resulten seropositivos previo a la inmunización, no podrán utilizarse en la prueba.

2.1.2 Procedimiento

Los cobayos se inmunizan con dos dosis de vacuna (con intervalo de 21 días), por vía subcutánea, con un volumen correspondiente a 1/5 de la dosis bovina. Los animales se mantienen bajo control 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 (30 DPV). 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 la técnica de IHA, (ANEXO I).

2.1.3 Interpretación

El análisis de regresión lineal del título de anticuerpo determinado por IHA realizado durante la validación del modelo cobayo para la valencia PI-3 indicó que la respuesta de anticuerpos inducida por la vacunación con vacunas experimentales con PI-3, en bovinos y cobayos, es 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. A partir de los resultados obtenidos en la curva dosis-respuesta, se estimaron puntos de corte o rango de títulos de Ac IHA anti-PI-3 que permiten diferenciar las vacunas según la inmunogenicidad inducida en cobayos y bovinos. Se establecieron dos puntos de corte y tres categorías (Tabla 1) (ver detalles técnicos de la validación en el ANEXO I).

Tabla 1. Puntos de corte de clasificación de vacunas para PI-3

ESPECIE	POTENCIA DE LA VACUNA Ac anti-PI-3 (IHA)		
	No Satisfactoria	Intermedia	Satisfactoria
COBAYO	$\bar{y} < 1.50$	$1.50 \leq \bar{y} \leq 2.4$	$\bar{y} < 2.4$
BOVINO	$\bar{Y} < 2.80$	$2.80 \leq \bar{Y} \leq 3.1$	$\bar{Y} < 3.1$

Tabla 1. Puntos de corte determinados como el \log_{10} del título de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación (IHA) o unidades inhibitorias de la hemoaglutinación de glóbulos rojos de cobayos causada por el virus de PI-3 bovino, presentes en el suero de cobayos y bovinos vacunados con la vacuna incógnita. (y) Título promedio de Ac de grupos de 5 cobayos, evaluado a los 30 días post vacunación (dpv); (Y) grupos de 5 bovinos 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 y 30 dpv.

Títulos de Ac IHA mayores a 2.4 en cobayos y 3.1 en bovinos se asociaron a vacunas de inmunogenicidad muy satisfactoria. Títulos de Ac IHA mayores a 1.50 en cobayos y 2.8 en bovinos se asociaron a vacunas de inmunogenicidad satisfactoria. En cambio, vacunas que inducen títulos de Ac IHA inferiores a dichos títulos se consideran no satisfactorias (ANEXO II).

2.1.4 Criterio de conformidad de la prueba en cobayos

La prueba de potencia en cobayos se considera un ensayo conforme cuando el promedio obtenido del título de Ac de los cobayos vacunados con una vacuna de referencia, de calidad satisfactoria, resulta el valor esperado (mayor a 1.50), y los cobayos controles no vacunados (testigos) permanecen seronegativos para Ac inhibidores de la hemoaglutinación contra PI-3 durante toda la experiencia.

2.1.5 Cálculos

Se evaluarán todos los sueros de los seis animales inmunizados con la vacuna en prueba. Se seleccionan los CINCO (5) sueros con mayor título obtenido (expresado en \log_{10} de las UIHA del suero) y sobre ellos se realiza el promedio.

2.1.6 Criterio de aprobación

Para la APROBACION de la vacuna sometida a control, el promedio del \log_{10} de los títulos de Ac IHA a los 30 dpv en los cobayos vacunados deberá ser mayor o igual a 1.50.

3. ARMONIZACIÓN DE ENSAYOS PARA LA REGIÓN

Se debe contar con un panel de sueros controles positivos y negativos para anticuerpos contra PI-3, así como vacunas de referencia. Estos reactivos de referencia locales se utilizarán para armonizar los resultados obtenidos por cada laboratorio de ensayos que adopte este método de control. La vacuna de referencia permitirá establecer la

conformidad del ensayo de inmunización de cobayos, mientras que el panel de sueros podrá utilizarse como control de la técnica serológica recomendada (IHA) y para la estandarización de otros ensayos alternativos (ELISA y VN).

4. REFERENCIAS

- Akkermans, A.M., Hendriksen, C.F., 1999, Statistical evaluation of numbers of animals to be used in vaccine potency testing: a practical approach. *Developments in biological standardization* 101, 255-260.
- Beyer, W.E., Palache, A.M., Luchters, G., Nauta, J., Osterhaus, A.D., 2004, Seroprotection rate, mean fold increase, seroconversion rate: which parameter adequately expresses seroresponse to influenza vaccination? *Virus research* 103, 125-132.
- de Jong, J.C., Palache, A.M., Beyer, W.E., Rimmelzwaan, G.F., Boon, A.C., Osterhaus, A.D., 2003, Haemagglutination-inhibiting antibody to influenza virus. *Developments in biologicals* 115, 63-73.
- Ellis, J.A., 2010, Bovine parainfluenza-3 virus. *The Veterinary clinics of North America* 26, 575-593.
- EMA/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).
- Haanes, E.J., Guimond, P., Wardley, R., 1997, The bovine parainfluenza virus type-3 (BPIV-3) hemagglutinin/neuraminidase glycoprotein expressed in baculovirus protects calves against experimental BPIV-3 challenge. *Vaccine* 15, 730-738.
- Halder, M., Hendriksen, C., Cussler, K., Balls, M., 2002, ECVAM's contributions to the implementation of the Three Rs in the production and quality control of biologicals. *Altern Lab Anim* 30, 93-108.
- Hendriksen, C.F., 2009, Replacement, reduction and refinement alternatives to animal use in vaccine potency measurement. *Expert review of vaccines* 8, 313-322.
- Lager, L., Sadir A, Schudel A: 1983, 1983, Enfermedades respiratorias virales de bovinos. . *J Información y Desarrollo en Investigación Agropecuaria* 1, 55-58.
- Lee, M.S., Greenberg, D.P., Yeh, S.H., Yogev, R., Reisinger, K.S., Ward, J.I., Blatter, M.M., Cho, I., Holmes, S.J., Cordova, J.M., August, M.J., Chen, W., Mehta, H.B., Coelingh, K.L., Mendelman, P.M., 2001, Antibody responses to bovine parainfluenza virus type 3 (PIV3) vaccination and human PIV3 infection in young infants. *The Journal of infectious diseases* 184, 909-913.
- Maidana, S.S., Lomonaco, P.M., Combessies, G., Craig, M.I., Diodati, J., Rodriguez, D., Parreno, V., Zabal, O., Konrad, J.L., Crudelli, G., Mauroy, A., Thiry, E., Romera, S.A., 2012, Isolation and characterization of bovine parainfluenza virus type 3 from water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Argentina. *BMC veterinary research* 8, 83.
- Marcoppido, G., Parreno, V., Vila, B., Antibodies to pathogenic livestock viruses in a wild vicuña (*Vicugna vicugna*) population in the Argentinean Andean altiplano. *Journal of wildlife diseases* 46, 608-614.
- Morein, B., Dinter, Z., 1975, Parainfluenza-3 virus in cattle: mechanisms of infections and defence in the respiratory tract. *Veterinarno-meditsinski nauki* 12, 40-41.
- Parreño, V.R., D.; Vena, M.; Izuel, M.; Fillippi, J.; Lopez, M.; Fernandez, F.; Bellinzoni, R. and Marangunich, L. 2010. Development and statistical validation of a guinea pig model as an alternative method for bovine viral vaccine potency testing. In *Symposium: Practical Alternatives to reduce animal testing in quality control of veterinary biologicals in the Americas*, PROSAIA, ed. (Buenos Aires).
- Parreño, V.V., María Marta; Rodriguez, Daniela; Izuel, Mercedes; Marangunich, Laura; Lopez, Virginia; Romera, Alejandra; Fillippi, Jorge; Bellinzoni, Rodolfo; Fernandez, Fernando. 2008. Validación estadística de un Modelo Cobayo aplicado al control de calidad inmunogénica

- de Vacunas Bovinas para los lirus de IBR, PI-3 y Rotavirus. In IX Congreso Argentino de Virología, SAV, A., ed. (Buenos Aires).
- Robert M. Chanock, B.R.M., and Peter L. Collins, 2001, CHAPTER 42 Parainfluenza Viruses, In: David M. Knipe, P.D.a.P.M.H., M.D. (Ed.) Fields Virology. pp. 1095-1126.
- Robles, C., 2008, Relevamiento sanitario e implementacion de un plan para la prevencion y control de enfermedades en bovinos de productores rurales minifundistas comunitarios de la provincia de Neuquén, ArgentinaSan Carlos de Bariloche.
- Taffs, R.E., 2001, Potency tests of combination vaccines. Clin Infect Dis 33 Suppl 4, S362-366.
- Zhu, Y.M., Shi, H.F., Gao, Y.R., Xin, J.Q., Liu, N.H., Xiang, W.H., Ren, X.G., Feng, J.K., Zhao, L.P., Xue, F., 2011, Isolation and genetic characterization of bovine parainfluenza virus type 3 from cattle in China. Veterinary microbiology 149, 446-451.

ANEXO I

PRUEBA DE POTENCIA PARA PI-3 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 μ l. Almacenamiento a -20°C hasta el momento de análisis. Rótulo: N° de protocolo, vacuna, n° de animal y tiempo postvacunación.

DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA IHA PARA EVALUAR TITULO DE ANTICUERPOS INHIBIDORES DE LA HEMOAGLUTINACION DE GLOBULOS ROJOS DE COBAYOS CAUSADA POR EL VIRUS PARAINFLUENZA TIPO 3 BOVINO.

Inhibición de la hemoaglutinación de GR de cobayo por el virus de PI-3

Este ensayo determina la presencia de anticuerpos dirigidos contra las hemoaglutininas virales, también llamados “inhibidores de la hemoaglutinación” en sueros de animales potencialmente expuestos al virus (infectados) o animales vacunados. Antes del ensayo, los sueros sufren un tratamiento con kaolín para adsorber inhibidores inespecíficos de la hemoaglutinación que pudieran estar presentes, este tratamiento deja a los sueros en una dilución inicial de 1/5. Luego, diluciones seriadas base 2 (5, 10, 20, 40, etc.) de los sueros se enfrentan a una concentración fija de virus, establecida en 8 UHA/25 μ l. La reacción se revela agregando glóbulos rojos de cobayo. Cuando en un suero existen anticuerpos específicos dirigidos a la HA viral, se forman complejos Ag-Ac que bloquean la hemoaglutinación e inhibirán su capacidad de aglutinar glóbulos rojos, es decir, se impide la unión del virus a los glóbulos en suspensión y consecuentemente se observa la formación de un botón rojo característico en el fondo del pocillo. Se tomará como punto final de la actividad del suero, la máxima dilución en la que el fenómeno de hemoaglutinación ha sido inhibido. La inversa de la dilución de suero multiplicada por el factor 8 determina las unidades inhibitorias de la hemoaglutinación del suero analizado.

MATERIALES

- Placa de 96 wells fondo en U limpias no estériles.
- Cubetas descartables o autoclavables, limpias, no estériles.
- Tips amarillos (hasta 200µl)
- Tips azules (hasta 1000 µl)
- Tubos plásticos de 1.8 ml tipo “eppendorf”
- Tubos cónicos de 15 ml
- Tubos cónicos de 50 ml
- Pipeta pasteur plástica
- Descarte
- Bolsas de autoclave verdes
- Papel absorbente
- Guantes de latex descartables
- Agujas 25/8
- Jeringa de 5 ml
- Algodón y alcohol

EQUIPOS

- Micropipeta hasta 200µl (tolerancia máxima admitida: 5ul)
- Micropipeta hasta 40µl (tolerancia máxima admitida: 0.4ul)
- Micropipeta hasta 1000 µl (tolerancia máxima admitida: 10ul)
- Micropipeta multicanal 8-12 hasta 5-50µl. Sin restricciones respecto a la tolerancia.
- Microcentrífuga (hasta 14.000 rpm)
- Centrifuga refrigerada (hasta 5.000 rpm)

REACTIVOS

- Virus de Trabajo: Suspensión de PI-3, ajustado a la concentración de 8 UHA/25 ul ó 16 UHA/ 50 ul
- Diluyente: PBS 1X, pH: 7.2-7.4
- Solución de Kaolín:

Kaolín	0,04g
PBS 1X	5 ml
- Glóbulos rojos de cobayos (ver obtención más abajo)
- Anticoagulante: Alsever 1X

- Sueros control: positivo y negativo
- Sueros Estándar: positivo y negativo

Preparación de controles: Los sueros controles corresponden a pools de sueros de cobayos vacunados con vacunas de concentración de Ag conocida. Para confeccionar los pools se seleccionan sueros con títulos medios (320-640 UIHA) (control positivo) y o sueros de animales negativos (control negativo). Como estándares se utilizar sueros de cobayos de título conocido, preferentemente altos (1260 UIHA) y sueros negativos de cobayos no vacunados.

TRATAMIENTO PREVIO DE LAS MUESTRAS

1. Inactivar los sueros durante 30 minutos a 56° C.
2. Colocar 50ul de suero en un tubo de 1.8 ml, agregar 50ul de la solución de Kaolín, homogenizar por vortex. Incubar durante 10 ± 2 minutos a temperatura ambiente (24-27° C).
3. Centrifugar durante 15 ± 2 minutos a 1500 rpm.
4. Tomar 50ul del sobrenadante y transferir a otro tubo con 75ul de PBS 1X y homogenizar con vortex (la dilución final del suero es de $1/2 * 2/5=1/5$).
5. Agregar 10 ul de paquete de GR, incubar en agitación suave a 37°C durante 30 minutos, centrifugar durante 15 ± 2 minutos a 1500 rpm. Tomar muestra del sobrenadante para realizar el ensayo o
6. transferir el sobrenadante en caso de congelar a -20°C hasta el momento de uso.
7. Los sueros controles y estándares positivos y negativos deben tratarse de igual manera que las muestras.

En el caso que los sueros no sean utilizados en ese momento, pueden almacenarse a -20° C y analizarse dentro de la semana de tratados.

PREPARACIÓN DE LA DILUCIÓN DE GLÓBULOS ROJOS

1. Preparar, en esterilidad, una jeringa con 1 ml de anticoagulante Citrato (o Alsever 1X al medio del volumen que se necesita de glóbulos)
2. Tomar muestra de sangre de un cobayo por punción cardiaca (4 ml + 1 ml anticoagulante = 5ml totales).
3. Una vez finalizada la extracción, sacar la aguja de la jeringa (descartar en descarte de material cortopunzante). Este procedimiento se realiza para evitar la hemólisis de los GR
4. Colocar la sangre en un tubo cónico de 15 ml, estéril. Centrifugar a 1500 ± 200 rpm, a 4-8° C durante 5 ± 1 min.
5. Eliminar la fase liquida utilizando una pipeta pasteur plástica o pipeta automática/tip de 1000ul.
6. Lavado: re-suspender el paquete de glóbulos en PBS 1X y llevar a un volumen de aprox. 15 ml. Centrifugar durante 10 minutos a 1800 ± 200 rpm a 4-8° C. Realizar 2 lavados. Descartar el sobrenadante.

IMPORTANTE: La suspensión de GR debe prepararse fresca en el momento de realización del ensayo. En cada lavado el sobrenadante debe mantenerse límpido, la presencia de un tinte rojizo es indicador de hemólisis y en ese caso los GR NO son aptos para su utilización en el ensayo.

- Preparar la dilución de trabajo de glóbulos: Primero se realiza una dilución $\frac{1}{4}$ (1 ml de paquete de glóbulos más 3 ml de PBS 1X) y luego partiendo de esta dilución se hace una dilución $\frac{1}{40}$ (1 ml de la dil $\frac{1}{4}$ más 29 ml de PBS 1X). De este modo se obtiene la dilución final de trabajo de $\frac{1}{120}$ ó 0.8%.
- Una vez hecha la dilución de GR se procede a titular y a ajustar el Virus PI-3 a la dilución de trabajo mediante la técnica de hemoaglutinación.

TITULACIÓN Y AJUSTE DE LA DILUCIÓN DE TRABAJO DEL VIRUS PI-3

1. Descongelar el virus en uso. Tomar una placa fondo en U, cargar 50ul de PBS 1X en 2 filas y cargar otra fila para el control de GR.
2. Agregar 50ul del virus de trabajo.
3. Realizar diluciones al medio, transfiriendo 50ul desde los pocillos 1 hasta 12.
4. Agregar 50ul de la dilución 1/120 glóbulos rojos en todos los pocillos.
5. Incubar a temperatura ambiente (20-27 °C) durante 1 hora.
6. Una vez que se visualiza la formación del botón de glóbulos en la hilera de control de GR, se puede proceder a la lectura.
7. El virus debe tener un título de 16 UHA/50ul (8 UHA/25ul). Si el título obtenido es menor, dicha suspensión NO ES APTA PARA EL ENSAYO. Si el título viral es mayor, diluir con PBS 1X y volver a titular.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO DE IHA

- Colocar 25ul de PBS 1X en toda la placa excepto en fila G.
- Agregar 25ul del suero tratado en los pocillos F, G y H.

(Se pueden analizar 12 muestras por placa de la fila 1 a 12 con 7 diluciones por muestra, ó se puede usar la placa apaisada, en cuyo caso se analizan 8 muestras de A a H con 11 diluciones por muestra)

- Realizar diluciones seriadas base 2, pasando 25ul, desde la fila F hasta la fila A, descartando los últimos 25ul.
- Los sueros estándares se colocan en forma aleatoria entre las muestras. Los sueros controles positivos y negativos se colocan al final de todos los sueros problemas ya tratados y del mismo modo que estos. Se deja una columna libre para realizar el control de glóbulos rojos y otra para realizar nuevamente la titulación de virus.
- Agregar 25ul de virus en la dilución establecida de uso (8 UHA/25 ul) en todas las filas, excepto en H que quedará como control de suero sin virus. Este último control cumple la función de detectar la presencia de actividad hemoaglutinante inespecífica en los sueros problema.
- Incubar las placas con la mezcla suero-virus durante una hora a temperatura ambiente (24-27° C).
- Agregar 50ul de la suspensión de glóbulos rojos (1/120) en todas las placas.
- Incubar a temperatura ambiente hasta la formación del botón de glóbulos en la columna de control de glóbulos.

LECTURA

La lectura se realiza por visualización directa.

ACEPTACIÓN DEL ENSAYO (CONFORMIDAD)

Para que un ensayo se considere conforme se deben cumplir los siguientes requisitos:

- o La suspensión de virus de trabajo debe dar un título de 16 UHA/50ul (8 UHA/25ul)
- o El botón de GR en los pocillos control debe ser sólido
- o Los sueros controles y estándares positivos deben dar el título esperado (se admite una variación de 1 dilución).
- o Los sueros controles y estándares negativos deben ser negativos.
- o Para determinar el título de una muestra, no debe observarse hemoaglutinación en el pocillo control de suero sin virus.

Se tomará como punto final de la actividad del suero (título de Ac IHA anti PI-3) a la inversa de la máxima dilución en la que el fenómeno de hemoaglutinación ha sido inhibido. El resultado final se expresa en Unidades Inhibidoras de la Hemoaglutinación (UIHA). Este resultado se obtiene multiplicando la recíproca de la dilución de punto final de la actividad del suero por las unidades hemoaglutinantes del virus utilizado (8 UHA). El resultado se expresará como el número de unidades inhibidoras de la hemoaglutinación del suero por unidad de volumen. Para discriminar resultados inespecíficos, los sueros positivos verdaderos producen un efecto de lagrimea al observar la placa en forma vertical.

Los bovinos que presenten reacciones IHA de diluciones inferiores o iguales a 1/10 (40-80 UIHA) se consideran no reactivos o inespecíficos. Valores superiores a 1/80 (640 UIHA o más) representan respuesta a la vacunación o a la infección natural.

Los cobayos a utilizarse en la prueba deben verificarse como no reactivos para Ac IHA contra PI-3 bovino. Los resultados del título de Ac IHA obtenidos a los 30 días post vacunación deberán expresarse como el \log_{10} de las UIHA a los fines de evaluar la vacuna. Botones de GR que no presenten efecto lagrimea al observar la placa en forma vertical se consideran falsos positivos.

INFORME DE RESULTADOS DE CALIDAD INMUNOGENICA DE VACUNAS DE PI-3 PROBADAS EN COBAYOS Y SUEROS EVALUADOS POR IHA

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

El ensayo será conforme siempre que 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 establecer la potencia de la vacuna, se calcula el título de UIHA de cada uno de los 5 cobayos vacunados (inversa de la dilución de suero multiplicada por 8). Luego cada valor individual se transforma en log en base 10. Las muestras negativas en la mínima dilución de suero ensayada (1/5) se expresan con un título arbitrario de 1 para los cálculos. La vacuna se considera APROBADA cuando el promedio es mayor o igual a 1.50.

Tabla 2. Título de Ac IHA anti PI-3

POCILLO	última Dilución con IHA	Titulo de la muestra (UIHA/25 ul) Dilución*8	Log10 del título en UIHA
H		Negativo/10	Negativo/1
G	5	40	1.60
F	10	80	1.90
E	20	160	2.20
D	40	320	2.50
C	80	640	2.80
B	160	1280	3.10
A	320	2560	3.40

Controles:

Control positivo cobayo: Pool de sueros de 5 cobayos vacunados con dos dosis de vacuna conteniendo 10^7 DICT₅₀/ml de PI-3 en adyuvante oleoso (Vacuna de Referencia) con un título de Ac s de 2.80.

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 IHA conocido, preferentemente alto 3.10-3.40

Estándar negativo: Suero normal de cobayo.