

28 de setembro de 2012

C A M E V E T

Cod: 000

TRAMITAÇÃO III

DATA: 4 de Julho de 2013

PROTOCOLO DE PROVA DE POTÊNCIA PARA VACINAS
BOVINAS QUE CONTENHAM NA SUA FORMULAÇÃO VÍRUS
PARAINFLUENZA TIPO 3 BOVINO (PI-3)



Protocolo nº 2 - G.B.

AUTORES

Participaram na confecção do protocolo as instituições representadas pelas seguintes pessoas (aparência na ordem alfabética), que formam o grupo ad hoc de vacinas virais combinadas bovinas da Fundación 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 Mediciniais Veterinários - CLAMEVET).
- **Dra. Marianna Ióppolo** (Câmara Argentina da Indústria de Produtos Veterinários - CAPROVE).
- **Dr. Eduardo Mórtoia** (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. Eliana Smitsaart** (Câmara Argentina da Indústria de Produtos Veterinários - CAPROVE).
- **Dra. María Marta Vena** (Médica veterinária. Consultora independente para pesquisas e desenvolvimento e assuntos regulatórios).

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

Tabela de conteúdos

1. Introdução	3
2. Protocolo: Controle de potência em cobaias	5
2.1. Desenho da prova	5
2.1.1. Cobaias	5
2.1.2 Procedimento	6
2.1.3. Interpretação	6
2.1.4. Critério de validação da prova	7
2.1.5. Cálculos	7
2.1.6. Critério de aprovação.....	7
3. Harmonização de ensaios para a região	7
4. Referências	8
Anexo I.....	10

PROVA DE POTÊNCIA PARA VACINAS BOVINAS QUE CONTENHAM NA SUA FORMULAÇÃO VÍRUS PARAINFLUENZA TIPO 3 BOVINO (PI-3)

1. INTRODUÇÃO

O vírus de Parainfluenza 3 bovino (PI-3), pertence ao gênero *Respirovirus* (Murphy et al., 1995) da família *Paramixoviridae*, ao orden *Mononegavirales*. As partículas virais são pleomórficas (usualmente esféricas ou filamentosas) de aproximadamente 150 nm de diâmetro e constam de uma nucleocápside de simetria helicoidal, rodeada de um envoltório derivado da membrana celular. No envoltório viral se apresentam duas glicoproteínas de superfície: a hemoaglutinina-neuraminidase (HN) e a proteína de fusão (F). Estas proteínas são consideradas os principais antígenos virais e são responsáveis pelo induzimento de uma resposta de anticorpos neutralizantes nos animais infetados (Robert M. Chanock, 2001). A hemoaglutinação, hemoadsorção, hemólise e fusão celular são atividades biológicas associadas às proteínas do envoltório viral.

O vírus de PI-3 bovino tem sido reconhecido extensamente durante anos como um agente causal de infecção endêmica do gado bovino. Atualmente, é reconhecido como um agente participante do complexo de doenças respiratórias do bovino, mas seu papel na patogenia é de menor importância que o do vírus respiratório sincicial bovino (VRSB). A apresentação clínica da infecção pelo PI-3 pode ser muito variável, desde infecções assintomáticas até doença respiratória severa caracterizada por tosse seca, febre e descarga nasal (Morein and Dinter, 1975). A apresentação clínica aparece principalmente em bezerros com baixos níveis de anticorpos passivos e em animais submetidos a estresse. A infecção pelo PI-3 pode contribuir a um estado de imunossupressão e lesão tissular que provoque uma broncopneumonia severa gerada por infecções bacterianas secundárias (Haanes et al., 1997). O PI-3 é reconhecido como um agente importante da pneumonia enzoótica em bezerros e como agente participante do complexo respiratório em bovinos de *feedlot* dos USA, e possivelmente a nível mundial. O vírus de PI-3 foi isolado pela primeira vez de bovinos com sintomas respiratórios nos Estados Unidos da América. Atualmente a infecção é endêmica e apresenta distribuição mundial. A infecção natural é, em geral, assintomática ou acostuma transitar com sintomatologia leve. No entanto, a infecção pelo PI-3 predispõe o gado a sofrer infecções bacterianas secundárias como pneumonia aguda por *pasteurella* ou a síndrome conhecida como “*shipping fever*” (Ellis, 2010). Na Argentina a infecção de PI-3 foi detectada por evidência sorológica na década de 80’ (Lager, 1983). Relevamentos sorológicos realizados na década de 2000 em rodeios bovinos não vacinados de Jujuy e Neuquén indicaram que 100% dos bovinos adultos resultaram soropositivos para anticorpos contra este

agente viral, indicando na alarga circulassem do agente nel país (Marcoppido et al., 2010 ; Robles, 2008).

Com relação à sua caracterização antigênica e genética, os vírus PI-3 bovinos se classificam atualmente em 3 genótipos: genótipo A distribuído principalmente nos EE UU e Europa, genótipo B descrito até agora unicamente na Austrália e o genótipo C apenas reportado na China (Zhu et al., 2011). Na Argentina o vírus tem se isolado de casos de doença respiratória de bovinos e de búfalos. As cepas detectadas em bovinos foram classificadas dentro dos genótipos A e C, enquanto as cepas detectadas em búfalos corresponderam a um vírus bovino pertencente ao genótipo B. Hasta el momento Argentina seria el primer país en reportar la circulación de los tres genotipos (Maidana et al., 2012).

As Hemoaglutininas (HA) presentes na superfície deste vírus podem ser bloqueadas na sua função pela presença de anticorpos. Eles se encaminham contra os antígenos específicos responsáveis pela união a glóbulos vermelhos. A Inibição da Hemoaglutinação (IHA) é uma técnica rápida, econômica e de fácil implementação em laboratórios de pouca infraestrutura que permite dosar estes anticorpos. Esta técnica sorológica é uma ferramenta útil para relevar a presença de animais infectados em um rodeio ou para avaliar a resposta induzida por uma vacinação, em bovinos e em animais de laboratório. Os animais expostos ao vírus (pós infecção e/ou vacinação) aumentam significativamente o título de anticorpos inibidores da hemoaglutinação (IHA). Para os agentes virais hemoaglutinantes das famílias virais orthomixoviridae e paramixoviridae o título de anticorpos IHA em soro se associa à proteção da infecção (Beyer et al., 2004; de Jong et al., 2003; Lee et al., 2001).

No mercado existem numerosas vacinas polivalentes para prevenir a síndrome respiratória do bovino. Vacinas inclui virus atenuado ou inativado, que se formulam em adjuvante aquoso ou oleoso com o vírus PI-3 inativado acompanhado de outros antígenos virais (BoHV-1, BDVD e BRSV) e antígenos bacterianos. O limiar mínimo de anticorpos calostrais que devem possuir os bezerros para estarem protegidos perante a infecção natural por PI-3 tem sido reportado como 1/32 (conforme nosso método, com título em UIHA = $32 * 8 = 256$; expresso em $\log_{10} = 2.4$) (Ellis, 2010).

Conforme sabemos, na região não há um critério unificado para avaliar a eficácia das vacinas inativadas que contém PI-3 na sua formulação.

2. PROTOCOLO: CONTROLE DE POTÊNCIA EM COBAIAS

Este protocolo descreve uma prova *in vivo* em animais de laboratório (cobaias) que permite avaliar a potência (imunogenicidade) de vacinas utilizadas na prevenção da síndrome respiratória bovina perante o PI-3.

Para a validação do modelo foram seguidas as recomendações internacionais para validação de métodos de controle de vacinas veterinárias, em particular, vacinas combinadas (EMEA/P038/97, 1998; Taffs, 2001). Foram avaliadas em paralelo, em bovinos e cobaias, vacinas experimentais e comerciais, formuladas em adjuvantes oleosos e aquosos, contendo a valência PI-3, combinada com concentração variável de outros antígenos virais (IBR, BVDV, VRSV) e bacterianos (*Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica* e *Histophilus sommi*). A imunogenicidade, medida em ambas as espécies como o título de anticorpos IHA contra PI-3 pós vacinação demonstrou altos índices de concordância entre o modelo e a espécie de destino (Parreño, 2010; Parreño, 2008). Os detalhes técnicos e estatísticos da validação são apresentados no ANEXO I deste protocolo. Esta prova pode ser utilizada para o controle de qualidade de cada série de vacina de PI-3 liberada no mercado, e torna-se uma ferramenta prática tanto para as empresas produtoras de vacinas como para o organismo de controle oficial, garantindo assim a presença no mercado de produtos padronizados e eficazes.

Com relação ao bem-estar animal, esta prova responde aos lineamentos dos organismos internacionais, sendo que substitui e reduz significativamente o uso de animais em provas experimentais (Akkermans and Hendriksen, 1999; Halder et al., 2002; Hendriksen, 2009).

O modelo cobaia desenvolvido é um ensaio *in vivo*, com um número limitado mas suficiente de animais (n=6 por vacina e 4 testemunhos/placebos) que facilita o desenvolvimento experimental (Akkermans and Hendriksen, 1999). Além disso, permite avaliar nas vacinas combinadas polivalentes a imunogenicidade induzida para todos os antígenos virais que a compõem.

2.1 Desenho da prova

2.1.1 Cobaias

São utilizados, no mínimo, 6 animais por cada vacina, maiores a 30 dias de idade e o peso deve ser de 400 gramas \pm 50 gramas. Podem utilizar-se machos ou fêmeas mas cada grupo deve conter animais do mesmo sexo, com um prazo de adaptação, após o ingresso à sala de inoculação, de SETE (7) dias, no mínimo. Depois deste período e antes de começar a imunização recomenda-se a colheita de amostras de soro para descartar a presença de Ac IHA

anti-PI-3. Caso os animais resultem soropositivos antes da imunização, não poderão utilizar-se na prova.

2.1.2 Procedimento

As cobaias se imunizam com duas doses de vacina (com um intervalo de 21 dias), por via subcutânea, com um volume correspondente a 1/5 da dose bovina. Os animais são mantidos sob controle durante um mínimo de 30 dias e se colhem amostras de soro na época da primeira dose de vacina (0 dias pós-vacinação) e 9 dias pós-revacinação (30 DPV). Junto com a avaliação da/s vacina/s incógnitas (n=6), são incluídos dois grupos de cobaias, um deles 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, são sangrados os animais vacinados realizando neles o controle sorológico pela técnica de inibição da hemoaglutinação (IHA) (ANEXO 2).

2.1.3 Interpretação

A análise de regressão linear do título de anticorpo determinado por IHA realizado durante a validação do modelo cobaia para a valência PI-3 indicou que a resposta de anticorpos induzida pela vacinação com PI-3, em bovinos e cobaias, é 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. A partir dos resultados obtidos na curva dose-resposta, foram identificados pontos de corte ou níveis de títulos de Ac IHA anti-PI-3 que permitem diferenciar as vacinas segundo a imunogenicidade induzida em cobaias e bovinos. Foram estabelecidos dois pontos de corte e três categorias (Tabela 1) (ver detalhes técnicos da validação no ANEXO I).

Tabela 1. Pontos de corte de classificação de vacinas para PI-3

ESPÉCIE	POTÊNCIA DA VACINA Ac anti-PI-3 (IHA)		
	Não Satisfatória	Satisfatória	Muito Satisfatória
COBAIA	$\bar{y} < 1.50$	$1.50 \leq \bar{y} \leq 2.4$	$2.4 < \bar{y}$
BOVINO	$\bar{Y} < 2.80$	$2.80 \leq \bar{Y} \leq 3.1$	$3.1 < \bar{Y}$

Tabela 1. Pontos de corte determinados como o log10 do título de anticorpos inibidores da hemoaglutinação (IHA) ou unidades inibitórias da hemoaglutinação de glóbulos vermelhos de cobaias causada pelo vírus de PI-3 presentes no soro de cobaias e bovinos vacinados com a vacina incógnita. (y) Título médio de Ac de grupos de 5 cobaias, avaliado a 30 dias pós vacinação (dpv); (Y) grupos de 5 bovinos 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 e 30 dpv.

Títulos de Ac IHA maiores de 2.4 em cobaias e 3.1 em bovinos se associaram a vacinas de imunogenicidade muito satisfatória. Títulos de Ac IHA dentre 1.50-2.4 em cobaias e 2.8-3.1 em bovinos se associaram a vacinas de imunogenicidade satisfatória. Por sua vez, as vacinas que induzem títulos de Ac IHA inferiores a ditos títulos se consideram não satisfatórias (ANEXO I).

2.1.4 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, de qualidade satisfatória, resulta no valor esperado (maior de 1.50 em cobaias e 2.80 em bovinos), e as cobaias controles não vacinados (testemunhas) permanecem soronegativos para Ac inibidores da hemoaglutinação contra PI-3 durante toda a experiência.

2.1.5 Cálculos

Serão avaliados todos os soros dos seis animais imunizados com a vacina sob controle. São selecionados os CINCO (5) soros com maior título obtido (expresso em \log_{10} das UIHA do soro) e sobre eles se realiza a média.

2.1.6 Critério de aprovação

Para a APROVAÇÃO da vacina submetida ao controle, a média do \log_{10} dos títulos de Ac IHA a 30 dpv nas cobaias vacinadas deverá ser maior ou igual a 1.50.

3. HARMONIZAÇÃO DE ENSAIOS PARA A REGIÃO

Deve existir um painel de soros controles positivos e negativos para anticorpos contra PI-3, bem como vacinas de referência. Estes reagentes de referência locais utilizar-se-ão para harmonizar os resultados obtidos por cada laboratório de ensaios que adotar esse método de controle. A vacina de referência permitirá estabelecer a conformidade do ensaio de imunização de cobaias, enquanto o painel de soros poderá ser utilizado como controle da técnica sorológica recomendada (IHA) e para a padronização de outros ensaios alternativos (ELISA e VN).

4. REFERÊNCIAS

- 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., Zabala, 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., Maria 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

DESCRIÇÃO DA TÉCNICA IHA PARA AVALIAR TÍTULO DE ANTICORPOS INIBIDORES DA HEMOAGLUTINAÇÃO DE GLÓBULOS VERMELHOS DE COBAIAS CAUSADA PELO VÍRUS PARAINFLUENZA TIPO 3 BOVINO.

PROCEDIMENTO

PROVA DE POTÊNCIA PARA PI-3 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.

Inibição da hemoaglutinação de GR de cobaia pelo vírus de PI-3

Este ensaio determina a presença de anticorpos dirigidos contra as hemoaglutininas virais, também chamados “inibidores da hemoaglutinação” em soros de animais potencialmente expostos ao vírus (infectados) ou animais vacinados. Antes do ensaio, os soros sofrem um tratamento com caolim para adsorver inibidores inespecíficos da hemoaglutinação que pudessem estar presentes, e este tratamento deixa os soros em uma diluição inicial de 1/5. Depois, diluições seriadas base 2 (5, 10, 20, 40, etc.) dos soros se enfrentam a uma concentração fixa de vírus, estabelecida em 8 UHA/25 μ l. A reação se revela adicionando glóbulos vermelhos de cobaia. Quando em um soro existem anticorpos específicos dirigidos à HA viral, formar-se-ão complexos Ag-Ac que bloquearão a hemoaglutinação e inibirão sua capacidade de aglutinar glóbulos vermelhos, quer dizer, impede-se a união do vírus aos glóbulos em suspensão e portanto observa-se a formação de um botão vermelho característico no fundo do recipiente. Considerar-se-á como ponto final da atividade do soro, a máxima diluição na que o fenômeno de hemoaglutinação tem sido inibido. A inversa da diluição de soro multiplicada pelo fator 8 determina as unidades inibitórias da hemoaglutinação do soro analisado.

MATERIAIS

- Placa de 96 wells fundo em U limpas não estéreis.
- Cubas descartáveis ou autoclaváveis, limpas, não estéreis.
- Tips amarelos (até 200µl)
- Tips azuis (até 1000 µl)
- Tubos plásticos de 1.8 ml tipo “ependorf”
- Tubos cônicos de 15 ml
- Tubos cônicos de 50 ml
- Pipeta pasteur plástica
- Descarte
- Bolsas de autoclave verdes
- Papel absorvente
- Luvas de látex descartáveis
- Agulhas 25/8
- Seringa de 5 ml
- Algodão e álcool

EQUIPAMENTOS

- Micropipeta até 200µl (tolerância máxima admitida: 5ul)
- Micropipeta até 40µl (tolerância máxima admitida: 0.4ul)
- Micropipeta até 1000 µl (tolerância máxima admitida: 10ul)
- Micropipeta multicanal 8-12 até 5-50µl. Sem restrições respeito à tolerância.
- Microcentrífuga (até 14.000 rpm)
- Centrifuga refrigerada (até 5.000 rpm)

REAGENTES

- Vírus de Trabalho:
- Suspensão de PI-3, ajustado à concentração de 8 UHA/25 ul ou 16 UHA/ 50 ul
- Diluente: PBS 1X, pH: 7.2-7.4
- Solução de Caolim:

Caolim	0,04g
PBS 1X	5 ml
- Glóbulos vermelhos de cobaias (vide obtenção mais abaixo)
- Alsever 1X
- Soros controle: positivo e negativo
- Soros Padrão: positivo e negativo

Preparação: Os soros controles correspondem a pools de soros de cobaias vacinados com vacinas de concentração de Ag conhecida. Para confeccionar os pools se selecionam soros com títulos meios (320-640 UIHA) (controle positivo) e/ou soros de animais negativos (controle negativo).

Como padrões são utilizados soros de cobaias de título conhecido, preferentemente altos (1260 UIHA) e soros negativos de cobaias não vacinadas.

TRATAMENTO PRÉVIO DAS AMOSTRAS

- Inativar os soros durante 30 minutos a 56° C.
- Colocar 50ul de soro em um tubo de 1.8 ml, adicionar 50ul da solução de Caolim, homogeneizar através de vortex. Incubar durante 10 ± 2 minutos a temperatura ambiente (24-27° C).
- Centrifugar durante 15 ± 2 minutos a 1500 rpm.
- Tomar 50ul do sobrenadante e transferir a outro tubo com 75ul de PBS 1X e homogeneizar com vortex. (a diluição final do soro é de $1/2 * 2/5=1/5$)
 - Adicionar 10 ul de pacote de GR, incubar em agitação suave a 37°C durante 30 minutos, centrifugar durante 15 ± 2 minutos a 1500 rpm. Tomar amostra do sobrenadante para realizar o ensaio ou transferir o sobrenadante em caso de congelar a -20°C até o momento de uso.
- Os soros controles e padrões positivos e negativos devem tratar-se de igual maneira que as amostras.

Caso os soros não sejam utilizados nesse momento, podem ser armazenados a -20° C e analisados dentro da semana de tratados.

PREPARAÇÃO DA DILUIÇÃO DE GLÓBULOS VERMELHOS

- Preparar, em esterilidade, uma seringa com 1 ml de anticoagulante Citrato (ou Alsever 1X na metade do volume que se precisa de glóbulos)
- Colher uma amostra de sangue de uma cobaia por punção cardíaca (4 ml + 1 ml anticoagulante = 5ml totais).
- Depois de finalizada a extração, tirar a agulha da seringa (descartar em descarte de material apropriado). Este procedimento se realiza para evitar a hemólise dos GR
- Colocar o sangue em um tubo cônico de 15 ml, estéril. Centrifugar a 1500 ± 200 rpm, a 4-8° C durante 5 ± 1 min.
- Eliminar a fase líquida utilizando uma pipeta pasteur plástica ou pipeta automática/tip de 1000ul.
- Lavagem: resuspender o pacote de glóbulos em PBS 1X e levar a um volume de aprox. 15 ml. Centrifugar durante 10 minutos a 1800 ± 200 rpm a 4-8° C. Realizar 2 lavagens. Descartar o sobrenadante.

IMPORTANTE: A suspensão de GR deve prepara-se fresca no momento de realizar o ensaio. Em cada lavagem o sobrenadante deve manter-se límpido, a presença de um tom avermelhado é indicador de hemólises e nesse caso os GR NÃO são aptos para sua utilização no ensaio.

- Preparar a diluição de trabalho de glóbulos: Primeiro se realiza uma diluição $\frac{1}{4}$ (1 ml de pacote de glóbulos mais 3 ml de PBS 1X) e depois, partindo desta diluição, faz-se uma diluição 1/40 (1 ml da dil $\frac{1}{4}$ mais 29 ml de PBS 1X). Deste modo se consegue a diluição final de trabalho de 1/120 ou 0.8%.
- Depois de feita a diluição de GR se procede a titular e a ajustar o Vírus PI-3 à diluição de trabalho mediante a técnica de hemoaglutinação.

TITULAÇÃO E AJUSTE DA DILUIÇÃO DE TRABALHO DO VÍRUS PI-3

1. Descongelar o vírus em uso. Tomar uma placa fundo em U, carregar 50ul de PBS 1X em 2 filas e carregar outra fila para o controle de GR.
2. Adicionar 50ul do vírus de trabalho.
3. Realizar diluições ao meio, transferindo 50ul desde os recipientes 1 até 12.
4. Agregar 50ul da diluição 1/120 glóbulos vermelhos em todos os recipientes.
5. Incubar a temperatura ambiente (20-27 °C) durante 1 hora.
6. Depois de visualizada a formação do botão de glóbulos na fileira de controle de GR, pode-se proceder à leitura.
7. O vírus deve ter um título de 16 UHA/50ul (8 UHA/25ul). Se o título obtido for menor, dita suspensão NÃO É APTA PARA O ENSAIO. Se o título viral for maior, diluir com PBS 1X e titular novamente.

PROCEDIMENTO DO ENSAIO DA IHA

- Colocar 25ul de PBS 1X em toda a placa salvo na fila G.
- Adicionar 25ul do soro tratado nos recipientes F, G e H.

(Podem ser analisadas 12 amostras, por cada placa, da fila 1 a 12 com 7 diluições por amostra, ou se pode usar a placa na posição horizontal, em cujo caso serão analisadas 8 amostras de A a H com 11 diluições por cada amostra)

- Realizar diluições seriadas base 2, passando 25ul, da fila F até a fila A, descartando os últimos 25ul.
- Os soros padrões se colocam de forma aleatória entre as amostras. Os soros controles positivos e negativos se colocam no final de todos os soros problemas já tratados e do mesmo modo que eles. Deixa-se uma coluna livre para realizar o controle de glóbulos vermelhos e outra para realizar novamente a titulação de vírus.
- Adicionar 25ul de vírus na diluição estabelecida de uso (8 UHA/25 ul) em todas as filas, salvo na H que ficará como controle de soro sem vírus. Este último controle cumpre a função de detectar a presença de atividade hemoaglutinante inespecífica nos soros problema.
- Incubar as placas com a mistura soro-vírus durante uma hora a temperatura ambiente (24-27° C).

- Adicionar 50ul da suspensão de glóbulos vermelhos (1/120) em todas as placas.
- Incubar a temperatura ambiente até a formação do botão de glóbulos na coluna de controle de glóbulos.

LEITURA

A leitura se realiza por visualização direta.

ACEITAÇÃO DO ENSAIO (CONFORMIDADE)

Para que um ensaio se considere conforme devem cumprir-se os seguintes requisitos:

- o A suspensão de vírus de trabalho deve dar um título de 16 UHA/50ul (8 UHA/25ul)
- o O botão de GR nos recipientes de controle deve ser sólido
- o Os soros controles e padrões positivos devem dar o título esperado (é admitida uma variação de 1 diluição).
- o Os soros controles e padrões negativos devem ser negativos.
- o Para determinar o título de uma amostra, não deve observar-se hemoaglutinação no recipiente de controle de soro sem vírus.

Será tomado como ponto final da atividade do soro (título de Ac IHA anti PI-3) à inversa da máxima diluição na qual o fenômeno de hemoaglutinação tem sido inibido. O resultado final se expressa em Unidades Inibidoras da Hemoaglutinação (UIHA). Este resultado se consegue multiplicando a recíproca da diluição de ponto final da atividade do soro pelas unidades hemoaglutinantes do vírus utilizado (8 UHA). O resultado manifestar-se-á como o número de unidades inibidoras da hemoaglutinação do soro por unidade de volume.

Os bovinos que apresentem reações IHA de diluições inferiores a 1/10 (40-80 UIHA) serão considerados não reatores. Valores superiores a 1/80 (640 UIHA ou mais) representam resposta à vacinação ou à infecção natural.

As cobaias a utilizar na prova devem verificar-se como não reatoras para Ac IHA contra PI-3 bovino. Os resultados do título de Ac IHA obtidos a 30 dias pós vacinação deverão ser expressados como o \log_{10} das UIHA a fim de avaliar a vacina.

RELATÓRIO DE RESULTADOS DE QUALIDADE IMUNOGÊNICA DE VACINAS DE PI-3 PROVADAS EM COBAIAS E SOROS AVALIADOS POR IHA

Os resultados podem ser interpretados e utilizados para classificar uma vacina no modelo cobaia por IHA desde que se tenha prestado conformidade ao ensaio e se tenha um mínimo de 5 animais para calcular o título médio de Ac induzido pela vacina.

O ensaio será válido desde que os soros das cobaias imunizadas com a vacina de referência denunciem um título médio dentro do nível estabelecido determinado por uma carta de controle com valor médio \pm dois desvios padrão obtido em 5 provas, no mínimo.

Para estabelecer a potência da vacina, calcula-se o título de UIHA de cada uma das 5 cobaias vacinadas (inversa da diluição de soro multiplicada por 8). Depois disso cada valor individual se transforma em log com base 10. As amostras negativas na mínima diluição de soro ensaiada (1/5) se expressam com um título arbitrário de 1, a fim dos cálculos. A vacina se considera APROVADA quando a média é maior ou igual a 1.50.

Tabela 2. Título de Ac IHA anti PI-3

Recipiente	Última Diluição que apresenta IHA	Título da amostra (UIHA/25 ul) = dil * 8 = título da amostra (log10)	título da amostra (log10)
G	5	40	1.6
F	10	80	1.9
E	20	160	2.2
D	40	320	2.5
C	80	640	2.8
B	160	1280	3.1
A	320	2560	3.4

Controles:

Controle positivo cobaia: Pool de soros de 5 cobaias vacinadas com duas doses de vacina contendo 10^7 DICT₅₀/ml de PI-3 em adjuvante oleoso (Vacina de Referência) com um título de Ac s de 2.80.

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 IHA conhecido, preferentemente alto 3.10-3.40

Padrão negativo: Soro normal de cobaia.