

5 de Abril de 2014
C A M E V E T
Cod: 000
TRÁMITE I
FECHA: 27 de septiembre de 2013

GUÍA DE PRUEBA DE POTENCIA PARA VACUNAS
BOVINAS INACTIVADAS QUE CONTENGAN ROTAVIRUS
BOVINO, AGENTE VIRAL ASOCIADO A LA DIARREA
NEONATAL DEL TERNERO



Guía N°3 – G.B

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Paseo Colón 315, 5to. Piso "D" (C1063ACD), Buenos Aires, Argentina
Tel: (54-11) 4331-3919 / 5158 - Fax: (54-11) 4331-5162
e-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

AUTORES

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

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

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

Tabla de contenidos

1. Introducción	3
2. Control de Potencia en Cobayos: Objetivos y Alcance	4
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 Criterios de validación de la prueba en cobayos.....	7
2.1.5 Cálculos	7
2.1.6 Criterio de aprobación de las vacunas en evaluación	8
3. Armonización de ensayos para la región	8
Referencias	8

GUÍA DE PRUEBA DE POTENCIA PARA VACUNAS BOVINAS INACTIVADAS QUE CONTENGAN ROTAVIRUS BOVINO, AGENTE VIRAL ASOCIADO A LA DIARREA NEONATAL DEL TERNERO

1. INTRODUCCION

El denominado complejo de la Diarrea Neonatal del Ternero (DNT) es una enfermedad multifactorial que afecta a los terneros recién nacidos y hasta los 3 meses de edad. Este síndrome representa un importante problema sanitario en las explotaciones de ganado bovino a nivel mundial. Las causas de la DNT pueden ser infecciosas o no infecciosas, sin embargo las diarreas infecciosas son las que originan los mayores problemas de mortalidad (Blanchard, 2012).

La etiología de esta enfermedad involucra agentes virales, bacterianos y parasitarios, entre ellos Rotavirus, Coronavirus, *Escherichia coli patógenas*, *Salmonella spp.*, *Clostridium perfringens*, *Cryptosporidium spp.* y coccidios (Blanchard, 2012).

Dentro de esta etiología compleja, la infección por Rotavirus bovino grupo A (RVA) es considerada la causa más importante de diarrea en terneros a nivel mundial (Badaracco et al., 2012; Blanchard, 2012; Cho et al., 2013).

Rotavirus bovino grupo A suele afectar a los terneros hasta las 8 semanas de vida, pero la susceptibilidad decrece a medida que la edad aumenta. La infección por RVA bovino se restringe a los enterocitos de la porción apical de las microvelocidades del intestino delgado de los terneros neonatos, y se sabe que es capaz de perturbar las superficies absorptivas del epitelio intestinal, produciendo diarrea. Hacia los tres meses de vida, los terneros en general ya no son susceptibles a la infección por ese virus (Blanchard, 2012; Dhama et al., 2009).

Entre las proteínas estructurales del virus se destacan la glicoproteína VP7 que conforma la superficie de la cápside externa y cuyas variantes se denominan G-tipos y las espículas virales conformadas por la proteína VP4, cuyas variantes se denominan P-tipos. Dentro de los RVA que circulan en bovinos, se han reportado los G-tipos: G1, G2, G3, G4, G5, G6, G8, G10 y G15; y los P-tipos P[1], P[5], P[11], P[14], P[17] y P[21]. Sin embargo, sólo G6, G10 y G8 asociados a P[5], P[11] y P[1] son considerados epidemiológicamente importantes (Badaracco et al., 2011, 2012; de Verdier Klingenberg et al., 1999; Fukai et al., 2004; Garaicoechea et al., 2006).

Las medidas de prevención empleadas a nivel mundial para controlar las DNT por RVA bovino se focalizan en tratar de disminuir la severidad del cuadro clínico en el ternero y el título de virus infeccioso excretado al medio ambiente. Como estrategia para aumentar la resistencia específica de los neonatos se recomienda la vacunación de las madres gestantes (60 y 30-45 días antes del parto) para favorecer la transferencia pasiva vía calostro de anticuerpos (Acs) al recién nacido (Kaplon et al., ; Parreño et al., 2004; Saif and Fernandez, 1996).

Los organismos regulatorios internacionales (APHIS, USA; EMEA-CVMP, UE; OIE; VICH) no han realizado recomendaciones para la elaboración y control de las vacunas para rotavirus. Sin embargo, dado el impacto sanitario de esta patología neonatal en las explotaciones ganaderas del país y la región, se considera importante el desarrollo e implementación de una prueba de control de potencia de estas vacunas en animales de laboratorio.

En esta guía se propone el uso de una prueba de control de potencia de vacunas de RVA en cobayos que permite controlar la calidad de los lotes de vacuna que se liberan al mercado. La prueba ha sido estadísticamente validada frente a la potencia de las vacunas obtenida en la especie de destino y posee un grado de concordancia óptimo para predecir la potencia de cada lote de vacuna en las hembras vacunadas. Asimismo se ha determinado la eficacia de las vacunas clasificadas según el modelo cobayo para prevenir la diarrea neonatal en terneros calostrados artificialmente con calostro de hembras vacunadas vs. no vacunadas (Parreño et al., 2012). El modelo propuesto representa una herramienta predictiva del grado de protección que confieren los anticuerpos calostrales frente a la descarga viral en terneros neonatos desafiados con RVA (Parreño et al., 2004).

En relación al bienestar animal, los organismos internacionales fomentan el desarrollo de pruebas *in vitro*, para evitar o reducir al mínimo el uso de animales para pruebas experimentales de control (Hendriksen, 2009). En el caso particular de estas vacunas acuosas u oleosas inactivadas, que contienen una o dos cepas de RVA bovino, acompañado de otros agentes bacterianos (*E. coli*, *Salmonella spp*) y agentes virales, como Coronavirus bovino, la aplicación de técnicas de control *in vitro* es posible y merece su exploración, pero dado que presentan el inconveniente de que deberían estandarizarse para cada formulación en particular (conjunto de antígenos virales inactivados, bacterinas y adyuvantes), aún se considera inevitable pasar por una prueba *in vivo* para evaluar la potencia de estos productos (Taffs, 2001).

2. CONTROL DE POTENCIA EN COBAYOS: OBJETIVOS Y ALCANCE

Esta guía describe una prueba *in vivo* en animales de laboratorio (cobayos) que permite evaluar la potencia (inmunogenicidad) y estimar la eficacia de vacunas utilizadas en la prevención de la DNT causada por RVA bovino. Los cobayos presentan la ventaja frente a otros animales de laboratorio, como ratones, que por su mayor tamaño permite que se puedan tomar muestras seriadas de suero, sin comprometer la vida del animal y

además es una de las pocas especies animales de laboratorio que no posee un rotavirus propio y son naturalmente seronegativos para Ac contra rotavirus. Finalmente, la evaluación serológica es independiente del tipo de adyuvante (oleoso o acuoso) y de la cantidad y calidad de los virus inactivados que componen la formulación.

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 (Hendriksen, 2009).

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 RVA bovino, combinada con antígenos bacterianos y virales asociados a la diarrea neonatal (*E coli*, *Samonella*, Coronavirus bovino, entre otros). La inmunogenicidad, medida en cobayos como el título de anticuerpos IgG anti RVA a los 30 días post vacunación fue correlacionada con el título de anticuerpos IgG1 anti-RVA en bovinos a los 60 días post vacunación –en coincidencia con el momento del parto. El isotipo IgG1 es selectivamente transferido del suero de la hembra al calostro durante la calostrogenesis y determina el grado de protección en los terneros neonatos (Parreño et al., 2004). Las técnicas de ELISA utilizadas fueron validadas bajo normas ISO 17025 y su procedimiento para sueros de cobayos se detalla en el ANEXO I.

El análisis realizado demostró altos índices de concordancia entre el modelo y la especie de destino. 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 de RVA bovino 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.

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 y agiliza la evaluación de la potencia para RVA de las vacunas inactivadas y combinadas que se utilizan para prevenir las diarreas neonatales del ternero.

2.1 Diseño de la prueba

2.1.1 Cobayos

Se utilizan como mínimo 6 animales por cada vacuna, mayores a 30 días de edad y el peso debe ser 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. Es importante destacar que los cobayos son naturalmente negativos a Ac contra RVA bovino.

2.1.2 Procedimiento

Los cobayos se inmunizan con dos dosis de vacuna (en un 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 ELISA para la detección de Ac contra RVA bovino (ANEXO I), en forma complementaria los sueros pueden analizarse por neutralización viral, técnica que permite determinar el título de Ac neutralizantes para cada uno de los serotipo de RVA incluido en las vacunas.

2.1.3 Interpretación

El análisis de regresión lineal del título de anticuerpos anti-RVA IgG total en cobayos e IgG1 en bovinos, determinados por ELISA, realizado durante la validación del modelo cobayo para la valencia RVA bovino indicó que la respuesta de anticuerpos inducida por la vacunación es directamente proporcional a la concentración de antígeno (Ag) contenido en la vacuna, en ambas especies, y el cobayo por ser seronegativo presentó mayor poder discriminante que los bovinos (ensayo dosis-respuesta, ANEXO II) (Parreño et al., 2012).

A partir de la curva de regresión lineal y utilizando el método de árboles de clasificación se estimaron los puntos de corte de clasificación de vacunas. Se establecieron dos puntos de corte para cada especie y tres categorías (Tabla 1) (ver detalles técnicos de la validación en el ANEXO II) (Parreño et al., 2012).

El modelo cobayo logró discriminar significativamente entre vacunas con concentraciones de virus de 10^4 , 10^5 y 10^6 UFFF/ dosis o mayor. Vacunas que inducen títulos de Ac mayores a 4.0 se consideran de inmunogenicidad satisfactoria, mientras que las vacunas que superan un título de 4.46 se consideran muy satisfactorias. Vacunas con títulos de Ac en el modelo cobayo mayores a 4.0 inducen en bovinos un incremento del título IgG1 anti RVA de 0.40 respecto de su nivel basal. Las vacunas con títulos mayores a 4.46 en cobayos inducen un aumento del título de IgG1 anti-RVA en los bovinos vacunados de 0.75 y títulos finales de 3.70 al momento del parto (60 dpv).

Estos puntos de corte fueron utilizados para evaluar el grado de concordancia entre la especie destino y el modelo cobayo para clasificar la potencia de vacunas.

En relación a la potencia de la vacuna en cobayos y bovinos y su eficacia para prevenir la diarrea en terneros, los estudios realizados indicaron que terneros que reciben 1 litro de calostro de vacas no vacunadas (título de Ac menor a 3.53), alcanzan títulos de Ac en suero entre 2.4-3.01 y desarrollan diarrea severa, mientras que terneros que reciben 1 litro de calostro de vacunas vacunadas (título de Ac mayor a 3.70) alcanzan títulos de Ac en

suero entre 4.21-4.81 presentan una reducción significativa de la severidad del cuadro clínico, (Parreño et al., 2012).

Tabla 1. **Puntos de corte Modelo Cobayo INTA / bovinos para estimar la potencia de vacunas de rotavirus**

Especie	POTENCIA			
	Estimada según el título de Ac por ELISA			
	No satisfactoria	Intermedia	Satisfactoria	Muy Satisfactoria
COBAYO	$\bar{y} < 1.93$	$1.93 \leq \bar{y} < 4.0$	$4.0 \leq \bar{y} < 4.46$	$\bar{y} \leq 4.46$
BOVINO Incremento título Ac (T60-T0)	$\bar{Y} < 0.33$	$0.33 \leq \bar{Y} < 0.40$	$0.40 \leq \bar{Y} < 0.75$	$\bar{Y} \leq 0.75$

X: concentración de RVA (UFF/ dosis de vacuna).

Puntos de corte determinados como el log₁₀ del título de anticuerpos anti RVA (IgG en cobayos) determinado por ELISA. En bovinos se analiza el incremento de Ac post vacunación respecto del título de Ac basal también determinados por ELISA, presentes en el suero de animales 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.

La prueba propuesta no necesita infraestructura ni tecnología compleja, sólo un bioterio con cobayos y técnicas serológicas corrientes (ELISA) de uso rutinario en los laboratorios de virología, correctamente armonizadas con normas internacionales (9.CFR, OIE, EMEA) y preferentemente validadas bajo normas ISO-IEC 17025.

2.1.4 Criterio de validación de la prueba en cobayos

La prueba de potencia en cobayos se considera válida cuando el promedio obtenido del título de Ac de los animales vacunados con una vacuna de referencia de calidad satisfactoria resulta igual o mayor al valor esperado (mayor a 4.0 en cobayos), y los animales controles no vacunados (testigos) permanecen seronegativos para Ac contra RVA durante toda la experiencia.

2.1.5 Cálculos

Se evaluarán todos los sueros de los seis animales inmunizados con la vacuna en control. Se seleccionan los CINCO (5) sueros con mayor título obtenido (expresado en log₁₀ de la

máxima dilución de suero que supera el cut off del ELISA) y sobre ellos se realiza el promedio aritmético.

2.1.6 Criterio de aprobación de las vacunas en evaluación

Para la APROBACIÓN de la vacuna sometida a control, el promedio del \log_{10} de los títulos de Ac IgG anti RVA a los 30 dpv en el suero de los cobayos vacunados deberá ser mayor o igual a 4.0

3. ARMONIZACIÓN DE ENSAYOS PARA LA REGIÓN

Se recomienda la elaboración de un panel de sueros controles positivos y negativos, así como vacunas de referencia. Estos reactivos de referencia locales deberán estar a disposición de los usuarios de la región y 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 (ELISA) y para la estandarización de otros ensayos alternativos (VN).

REFERENCIAS

- Badaracco, A., Garaicoechea, L., Rodriguez, D., Uriarte, E.L., Odeon, A., Bilbao, G., Galarza, R., Abdala, A., Fernandez, F., Parreno, V., 2011, Bovine rotavirus strains circulating in beef and dairy herds in Argentina from 2004 to 2010. *Veterinary microbiology* 158, 394-399.
- Badaracco, A., Garaicoechea, L., Rodriguez, D., Uriarte, E.L., Odeon, A., Bilbao, G., Galarza, R., Abdala, A., Fernandez, F., Parreno, V., 2012, Bovine rotavirus strains circulating in beef and dairy herds in Argentina from 2004 to 2010. *Veterinary microbiology* 158, 394-399.
- Blanchard, P.C., 2012, Diagnostics of dairy and beef cattle diarrhea. *The Veterinary clinics of North America* 28, 443-464.
- Cho, Y.I., Han, J.I., Wang, C., Cooper, V., Schwartz, K., Engelken, T., Yoon, K.J., 2013, Case-control study of microbiological etiology associated with calf diarrhea. *Veterinary microbiology*.
- de Verdier Klingenberg, K., Vagsholm, I., Alenius, S., 1999, Incidence of diarrhea among calves after strict closure and eradication of bovine viral diarrhea virus infection in a dairy herd. *J Am Vet Med Assoc* 214, 1824-1828.
- Dhama, K., Chauhan, R.S., Mahendran, M., Malik, S.V., 2009, Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals. *Veterinary research communications* 33, 1-23.
- 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).
- Fukai, K., Onoda, H., Itou, T., Sato, M., Miura, Y., Sakai, T., 2004, Genetic and serological characterization of novel serotype G8 bovine group A rotavirus strains isolated in Japan. *J Vet Med Sci* 66, 1413-1416.

- Garaicoechea, L., Bok, K., Jones, L.R., Combessies, G., Odeon, A., Fernandez, F., Parreno, V., 2006, Molecular characterization of bovine rotavirus circulating in beef and dairy herds in Argentina during a 10-year period (1994-2003). *Veterinary microbiology* 118, 1-11.
- Hendriksen, C., 2009, Replacement, reduction and refinement alternatives to animal use in vaccine potency measurement. *Expert Rev Vaccines* Mar, 313-322.
- Kaplon, J., Fremy, C., Bernard, S., Rehby, L., Aho, S., Pothier, P., Ambert-Balay, K., Impact of rotavirus vaccine on rotavirus genotypes and caliciviruses circulating in French cattle. *Vaccine* 31, 2433-2440.
- Parreño, V., Bejar, C., Vagnozzi, A., Barrandeguy, M., Costantini, V., Craig, M.I., Yuan, L., Hodgins, D., Saif, L., Fernandez, F., 2004, Modulation by colostrum-acquired maternal antibodies of systemic and mucosal antibody responses to rotavirus in calves experimentally challenged with bovine rotavirus. *Veterinary immunology and immunopathology* 100, 7-24.
- Parreño, V., Lopez, M., Vena, M., Rodriguez, D., Fillippi, J., Vega, C., Marcoppido, G., Marangunich, L., Fernández, F., 2012. Statistical validation of a guinea pig model as an alternative method for bovine rotavirus vaccines potency testing. In: 11th International Symposium on Double-Stranded RNA Viruses
San Juan, Puerto Rico, November 27 – December 1, 2012.
- Saif, L.J., Fernandez, F.M., 1996, Group A rotavirus veterinary vaccines. *The Journal of infectious diseases* 174 Suppl 1, S98-106.
- Taffs, R.E., 2001, Potency tests of combination vaccines. *Clin Infect Dis* 33 Suppl 4, S362-366.