

**PRODUCCIÓN Y EVALUACIÓN DE UNA
VACUNA INACTIVADA CONTRA ROTAVIRUS
BOVINO**

Reina Tibisay Escobar Ladrón de Guevara

Trabajo de tesis presentado para obtener el título de Magister en Biotecnología

Tutor: **Dra. Mabel Berois**

Co -Tutor: **Dr. Juan Arbiza**

Tribunal: Dra. Viviana Parreño

Dr. Uruguayisito Benavides

Dra. Dora Ruchansky.

Facultad de Ciencias – Sección de Virología
Universidad de la República, Montevideo Uruguay
Laboratorio de Virología – Laboratorio Santa Elena S.A.

Montevideo, Marzo 2012

*Caminos largos e intrincados solo son
recorridos por los decididos y perseverantes.
Un alma plena será el regalo a su determinación.*



AGRADECIMIENTOS

Agradecer a todas las personas que de alguna manera contribuyeron con la realización de esta tesis, en como máximo dos páginas es imposible. La finalización de este proyecto se debe principalmente a un trabajo en conjunto, orquestado por mi persona. Mil gracias a todos los que participaron.

Y otorgando honor a quien honor merece puedo decir:

Gracias a mi esposo Jan, sin su amor, paciencia e incondicionalidad, no hubiese logrado ni llegar a Uruguay....

A mi mama, que fue mi presencia en Venezuela, logrando en mi ausencia, metas inimaginables en mi nombre y su increíble apoyo logro cruzar fronteras...

A mis hijos Isabella y Angelo, que día a día con su amor y travesuras llenan mi vida, por ellos hasta los peores inconvenientes se trasforman en mera banalidad...

A Mabel, que más que un tutor académico, fue una amiga y un apoyo en situaciones difíciles, con una amabilidad y una comprensión digno de ejemplo. En mi opinión personal, la sociedad necesita más personas como ella. Esta tesis es de las dos....

A Juan Arbiza, quien me abrió las puertas de la sección y me otorgo este bello proyecto...

A todos mis compañeros de laboratorio y profesores de la sección de Virología de la Facultad de Ciencia, que me aceptaron como una más del grupo desde el inicio y siempre se encontraban dispuesto ayudar en cual momento y con toda la disposición del caso. Y sobre todo quiero agradecer de manera especial a Virginia, Alvaro Alberti, Luciana, Andres, Santiago, Natalia Olivero, Andrea y Natalia Ramos, a quienes en algún momento llegar a fastidiar más de lo debido....

A la junta directiva y el departamento de Desarrollo del laboratorio Santa Elena que me brindo la posibilidad de elaborar este proyecto juntos con ellos....

Al personal del laboratorio Santa Elena lo cuales fueron muy receptivos con mi llegada y a pesar de ser solo una estudiante, me trataron como una más del equipo. En especial quiero agradecer a Cecilia, a Eduardo, a Rodrigo, a Fernando, a Alvaro, a Ruben, a Nicole, a Marta, a Iliana, a Mónica, a Vero, a Maria y Augusto....

A Patricia, quien fue mi compañera hombro a hombro en Santa Elena y hoy día una buena amiga!!!



A la Prof. Mónica Marín, quien nos recibió a nuestra llegada, nos orientó y nos apoyó en las situaciones difíciles y siempre estuvo al pendiente de nuestras necesidades como estudiantes extranjeros....

A Prof. Andrea Villariño y a su grupo de trabajo quienes incondicionalmente ofrecieron su apoyo y conocimientos para poder hacer posible el ensayo de Western Blot.

A Dra. Elena de Torres, directora del Campo Experimental N° 2 de la Facultad de Veterinaria, quien permitió realizar el ensayo de inmunización en bovinos en este establecimiento. A Adriana y a Maximiliano, quienes me ayudaron en la ejecución del mismo.

A todos mis compañeros de Fundayacucho, principalmente a Danny y Eduardo, más que compañero de estudios, fueron parte de mi familia durante estos 3 años en Uruguay...

A la Fundación Gran Mariscal de Ayacucho, al INIA en Venezuela y la Facultad de Ciencias de la UDeLaR, por el aporte económico brindado, por el cual fue posible la realización de esta tesis y de esta maestría...

A la Dra. Viviana Parreño y a la sección de Virus Entéricos del INTA – Argentina, quienes aportaron conocimientos, información y reactivos vitales para el desarrollo de la tesis. Principalmente a Viviana, a quien fastidie reiteradas veces vía mail, y quien siempre respondió sencilla y muy amablemente a todas mis preguntas. Gracias, Viviana!!!!

A “Tito” quien siempre condujo el vehículo de manera desinteresada y amena, mostrándome los lugares más lindo tal guía turístico y ofreciendo consejos de vida durante todo el recorrido....

Al excelente servicio de Solicitud de Artículos de la Biblioteca de la Facultad de Ciencias....

A los profesores el Jurado por haber dedicado parte de su tiempo para la evaluación y corrección de la tesis

Y por último a todos aquellos “Uruguayos” que me ofrecieron más allá de un apoyo, una amistad sincera rompiendo con las barreras de diferencias de cultura y de acento: Mabel, Patricia, Cecilia, Rodrigo, Andres (chanchito), Ana, Virginia, Alvaro, Fernando, Marta, Mónica, Iliana, Nicole, Gabriel....



RESUMEN



La inmunidad pasiva obtenida vía calostro en terneros es la primera respuesta protectora desarrollada contra los patógenos generadores del síndrome de la Diarrea Neonatal Bovina, donde el Rotavirus Bovino (RVB) es uno de los principales agentes causales. La inmunización de las madres en el último tercio de la gestación, es la primordial acción que se realiza para la prevención y disminución de esta patología en los rebaños bovinos. Los programas de vacunación suelen tener grado de efectividad variable, influenciados por factores del proceso de producción de la vacuna. Este proyecto de tesis tuvo como principal objetivo la producción y evaluación de la primera vacuna inactivada contra Rotavirus Bovino producida en Uruguay, la cual servirá como base para el mejoramiento del diseño y la calidad de vacunas futuras contra esta patología.

Se realizaron 3 formulaciones con diferentes diseños y tipos de adyuvante para poder conocer la influencia de cada uno de estos factores en el desarrollo de la respuesta inmune. En las formulaciones se generó una vacuna monovalente Acuosa (VMA) una vacuna monovalente Oleosa (VMO) y una vacuna polivalente Oleosa (VPO). Se utilizó como cepa vacunal, cepa rotaviral bovina WC3. Los controles de calidad pertinentes, su totalidad resultaron satisfactorios. Como sistema biológico en la prueba de potencia se empleó la especie cobayo. Se desarrolló y estandarizó exitosamente, métodos basados en la técnica de ELISA para la detección de antígenos de Rotavirus Bovino y detección de Anticuerpos isotipo IgG anti-RVB. También se desarrolló y estandarizó técnicas de titulación viral y de seroneutralización propias y originadas para esta tesis.

En el ensayo de potencia en cobayos, la VMO obtuvo mayores títulos de anticuerpos ya sean AcN o IgG totales, seguida por la VPO y la VMA. Existió solo diferencia significativa en los resultados de AcN entre la VMA y VMO para el día 60 PV. Las 3 vacunas superaron el límite de potencia establecido para ser consideradas como satisfactorias, a los días 30 y 60 PV. En el ensayo de eficacia vacunal a nivel de campo, la vacuna logró inducir altos títulos de anticuerpos a nivel de suero, calostro y leche en las madres inmunizadas, con respecto a las madres controles. Buenos títulos de IgG se mantuvieron en la leche hasta el día 21 post nacimiento (PN). En los terneros hijos de madres vacunadas (GV), se alcanzó un buen nivel de inmunidad pasiva, ninguno de los terneros GV mostró sintomatología diarreica ni se detectó antígenos rotavirales en las muestras de heces. Los dos terneros que conformaron el grupo hijos de madres no vacunadas (GC), presentaron sintomatología diarreica y se les detectó antígenos rotavirales a nivel de las heces los días 15 y 21 PN.

Se puede concluir en términos generales, que se obtuvo un resultado muy satisfactorio a nivel de calidad, inocuidad y potencia en la producción de la vacuna inactivada contra el RVB, con la utilización de la cepa de RVB WC3.



ÍNDICE



CONTENIDO

PÁGINAS

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El Género Rotavirus	2
1.1.2 Genoma del Rotavirus	2
1.1.3 Estructura del Rotavirus	3
1.1.4 Proteínas Virales del Rotavirus	4
1.1.5 Clasificación del Rotavirus	6
1.1.6 Ciclo Replicativo	7
1.2 Rotavirus Bovino	9
1.2.1 Epidemiología del RVB	10
1.2.2 Patogenicidad del RVB	11
1.2.3 Inmunidad pasiva en el tracto intestinal en terneros	14
1.3 Vacunas Veterinarias Generalidades	17
1.3.1 Vacunación contra RVB	21

2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis	27
2.2 Objetivos Generales	27
2.3 Objetivos Específicos	27



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1	Virus y Células	30
	3.1.1 Virus	30
	3.1.2 Línea Celular	30
3.2	Multiplicación del Virus	30
3.3	Titulación Viral	31
	3.3.1 Titulación por Dosis Infecciosa 50.	31
	3.3.2 Titulación mediante Inmunofluorescencia Directa.	32
3.4	Genotipificación de Cepas Virales	33
3.5	Producción Inoculo Viral Vacunal	36
	3.5.1 Producción del sistema de banco de células	36
	3.5.2 Producción del sistema de semilla viral	37
	3.5.3 Producción del Antígeno viral.	37
	3.5.4 Inactivación del Antígeno Viral	37
	3.5.5 Controles de Esterilidad	38
	3.5.6 Controles Fenotípico y Genotípicos de la cepa viral vacunal	39
	3.5.7 Control de inocuidad del antígeno inactivado	39
3.6	Adjuvantes Utilizados para la Formulación del Antígeno Vacunal	39
3.7	Ensayo de Inmunización	42
	3.7.1 Protocolo de Inmunización en Cobayos	42
	3.7.2 Protocolo de Inmunización en Bovinos	42



3.8 Detección de Antígeno Viral	43
3.8.1 Técnica de ELISA KERI	43
3.8.2 Técnica de ELISA modificada	45
3.9 Detección de Anticuerpos Anti – Rotavirales	44
3.9.1 Técnicas de Seroneutralización	
3.9.1.1 Seroneutralización por Dosis Efectiva 50.	45
3.9.1.2 Seroneutralización por Reducción de Foco Fluorescente	46
3.9.2 Técnicas de ELISA.	
3.9.2.1 Técnica de ELISA para detención de anticuerpo anti rotavirus IgG totales. INTA	47
3.9.2.2 Técnica de ELISA para detención de anticuerpo anti rotavirus IgG totales. Tesis	48
3.9.3 Técnica de Western Blot	49
3.10 Análisis Estadísticos	50
4. RESULTADOS	
<hr/>	
4.1 Producción de la Vacuna Inactivada Contra Rotavirus Bovino	
4.1.1 Caracterización y titulación de las cepas de Rotavirus bovino empleadas en esta tesis	52
4.1.2 Comparación entre los métodos de titulación viral	54
4.1.3 Genotipificación de cepas virales	56
4.1.4 Producción del Inóculo Viral Vacunal	59



4.1.5 Controles de Seguridad	59
4.1.6 Formulación de tres tipos de vacunas: Monovalente Acuosa, Monovalente Oleosa y Polivalente Oleosa	61
4.2 Desarrollo de Métodos para la Detección del Antígeno Rotavirus Bovino y la Detección de Anticuerpos Anti-Rotavirus.	63
4.2.1 Detección del Antígeno Viral	63
4.2.1.1 Control de Masa antigénica Vacunal	65
4.2.1.2 Técnica de ELISA para la detección de antígeno de Rotavirus implementada en esta tesis.	67
4.2.2 Detección de Anticuerpos Anti-Rotavirus	
4.2.2.1 Técnicas de Seroneutralización	69
4.2.2.2 Técnica de ELISA para detección de anticuerpo anti rotavirus IgG totales.	71
4.3 Evaluación de los Títulos de Anticuerpos en los Animales Vacunados y Verificación de la Potencia Vacunal.	
4.3.1 Evaluación de la respuesta de anticuerpos IgG Totales anti-RVB en cobayos vacunados.	73
4.3.2 Evaluación de la respuesta de Anticuerpos neutralizantes anti-RVB en cobayos vacunados.	76



4.3.3 Detección de la Reactividad de los Anticuerpos	
Vacunales de cobayos hacia las proteínas de RVB.	79
4.3.4 Estudio de la reacción cruzada entre	
cepas homologas y heterólogas a la	
WC3 en cobayos vacunados.	81
4.3.4.1 Cepa RVB INDIANA	81
4.3.4.2 Cepa RBV B223	83

4.3.5 Evaluación de la Respuesta de Anticuerpos Anti-RVB en	
 Bovinos Vacunados.	84
4.3.5.1 Muestras de calostro	84
4.3.5.2 Suero de las Madres.	86
4.3.5.3 Suero y Materia Fecal de los Terneros Nacidos.	88
4.3.5.4 Protección Heteróloga en Bovinos	93

5. DISCUSIÓN

5.1 Proceso de Producción de la Vacuna	97
5.2 Estandarización de Métodos	101
Detección del Antígeno Rotaviral	101
Evaluación de la masa antigénica vacunal	103
Pruebas de Seroneutralización	104



5.3 Medición de Respuesta Serológica en Cobayos Inmunizados	
Respuesta de los IgG totales	106
Respuesta de los Anticuerpos Neutralizantes	108
Respuesta específica de anticuerpos las proteínas rotavirales	109
Reacción cruzada entre cepas homologas y heterologas a la WC3 en cobayos vacunados.	110
5.4 Ensayo de Inmunización en Bovinos	111
Respuesta de la vacunación en las madres.	112
Respuesta de la vacunación en los terneros.	115
Nivel de protección heteróloga en las madres y terneros	116
6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	118
<hr/>	
7. BIBLIOGRAFÍA	124
<hr/>	
8. ANEXO	141
<hr/>	
8.1 Constancia de elaboración de Instructivos	
Bajo el Sistema de Control de Calidad del Laboratorio Santa Elena para las técnicas de ELISA estandarizadas para la tesis, ELISA detección de Antígenos de RVB y ELISA para la detección de Anticuerpos IgG anti-RVB.	142



1. INTRODUCCIÓN



1.1 El Género Rotavirus

Los Rotavirus (RV) son considerados importantes agentes causales de diarrea en individuos de corta edad de numerosas especies animales y en humanos.

Este Género pertenecen a la familia *Reoviridae*. Todos los miembros de la familia poseen un genoma formado por 10 a 12 segmentos de ARN de doble cadena (ARNdc), miden entre 60 y 85 nm, carecen de envuelta lipídica, presentan proteínas distribuidas en capas concéntricas siguiendo una simetría icosaédrica y la replicación tiene lugar en el citoplasma, formándose estructuras particulares denominadas viroplasma donde ocurre el ensamblaje de la cápside y el empaquetamiento del ARN viral.

1.1.2 Genoma del Rotavirus

El genoma del Rotavirus contiene once segmentos de ARNdc de cadena doble con un peso molecular que oscila en un rango de 2×10^5 y 20.2×10^4 Daltons, con un tamaño de 0.6 a 3.3 Kilopares de bases. Esta diferencia de tamaños permite que estos segmentos al ser separados electroforéticamente presenten un patrón característico, típico y único para estos virus, lo que ha sido la base para el desarrollo métodos de diagnóstico moleculares [6]. Los segmentos de ARN viral están numerados según la velocidad de migración que presentan en gel de poliacrilamida [1]. En general el patrón electroforético o electroferotipo, consiste de un grupo de cuatro segmentos de ARN (1-4) de alto peso molecular; 5 segmentos de tamaño mediano (5 a 9) que incluyen un triplete muy característico formado por los segmentos 7, 8 y 9; y los dos segmentos más pequeños (10 y 11), como se indica en la Figura 1.

Los once segmentos de RNAdc se encuentran dentro del core de las partículas virales y no son infecciosos por sí solos. Las partículas virales poseen su propio enzima ARN polimerasa ARN dependiente, el cual transcribe cada segmento individual en un ARN mensajero (ARNm). En cada segmento de ARN se pueden identificar tres regiones, la región no codificante (UTR: untranslated región) 5', la región no codificante 3' y el marco de lectura abierto (ORF: Open Reading Frame). Las longitudes de las regiones no codificantes pueden variar de segmento a segmento, pero todos contienen una secuencia consenso común en el extremo 5' y otra en el extremo 3' cuyas funciones aún no están del todo dilucidadas pero se cree que están implicadas en los mecanismos de transcripción, replicación, regulación y encapsidación de dichos genes [1].



1.1.3 Estructura del Rotavirus.

Estudios realizados por criomicroscopía electrónica, han permitido realizar análisis detallados de las características estructurales de la partícula viral con una resolución de aproximadamente 26 Å [2, 3, 4]. Las partículas virales tienen aproximadamente 75 nm de diámetro, con una geometría icosaédrica. El virión maduro está compuesto por tres capas concéntricas de proteína que engloban al genoma viral. La capa externa del virión está formada por 780 moléculas de la glicoproteína VP7. De esta capa lisa se proyectan 60 espículas de aproximadamente 12 nm de longitud constituidas por dímeros de la proteína VP4 [2], la base de éstos dímeros de VP4 interacciona con la capa intermedia del virión (Figura 1).

Esta capa intermedia, consta de 260 unidades morfológicas constituidas por trímeros de la proteína VP6, como se observa en la Figura 1, esta proteína es la más abundante del virus, constituyendo aproximadamente el 50% de la proteína total del virión. La capa intermedia, a su vez, rodea a la capa más interna del virión o nucleocápside, que está formada por 60 dímeros de la proteína VP2 (Figura 1), la cual engloba al genoma viral. Una copia de la proteína VP1 y una de VP3 están asociadas con la cara interna de la capa de VP2 y localizadas en los doce vértices del icosaedro, donde se ha propuesto que llevan a cabo su función de replicar y modificar los genes del virus. También dentro de esta nucleocápside se encuentran los once segmentos de ARN de doble cadena que constituyen el genoma del virus.

Existen tres tipos de partículas virales con diferentes características estructurales y funcionales: se encuentra la partícula completa conocida como partícula triple capa (“Triple-Layered Particle”, TLPs). Esta es la partícula infecciosa ya que la presencia de la capa externa formada por las proteínas VP4 y VP7 le permite unirse y penetrar a su célula huésped [5, 6]. La partícula carente de la capa más externa, se conoce como partícula de doble capa, (“Doble-Layered Particle”, DLPs). Presenta una morfología muy rugosa debido a que la periferia muestra subunidades triméricas de la cápside interna [1]. Esta partícula no es infecciosa, pero es transcripcionalmente activa con capacidad de sintetizar los ARN mensajeros virales. Por último esta la partícula de capa simple, la cual sólo muestra el “core” o nucleocápside, formada por la VP2 mayoritariamente, con la polimerasa inactiva [1].

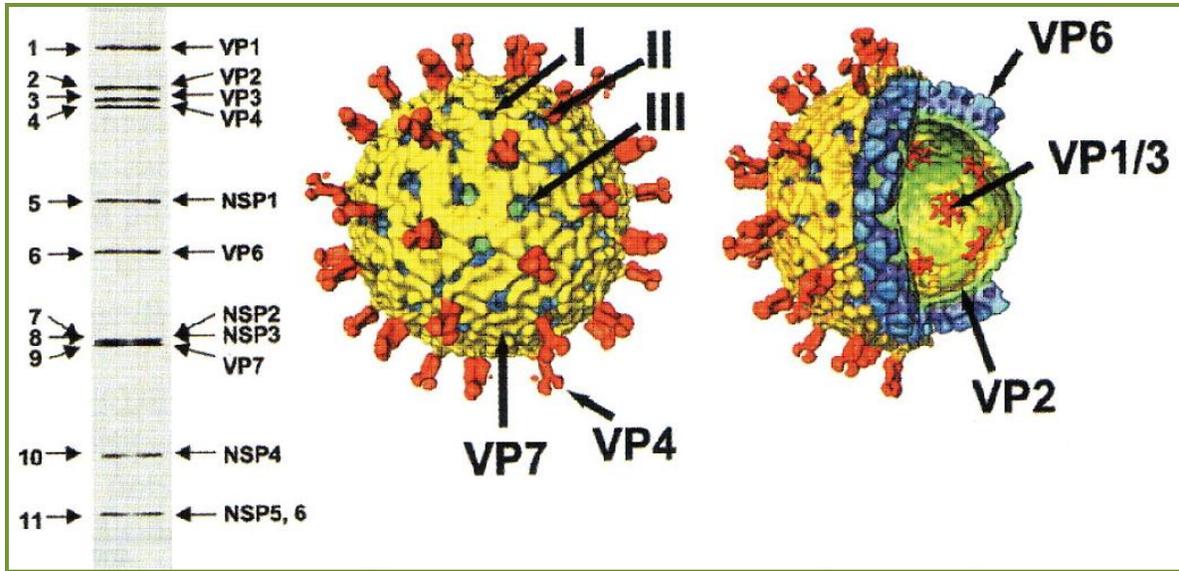
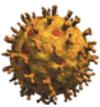


Figura 1 Organización estructural de la partícula de Rotavirus: A la izquierda de la figura se muestra el electroferotipo característico del genoma viral donde se indica los 11 segmentos de ARN con la asignación de proteínas que codifican a la derecha. Al centro de la figura se representa un modelo de la organización superficial de la partícula viral reconstituida a partir de estudios de criomicroscopía electrónica. A la derecha se representa la misma estructura luego de un corte transversal que muestra la capa intermedia constituida por VP6 y, el núcleo constituido por VP2, VP1/VP3. Extraído y adaptado de Pesavento, et al, 2006 [8].

1.1.4 Proteínas Virales del Rotavirus.

En total el genoma codifica para 12 proteínas, seis estructurales (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP7) y seis no estructurales (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5, NSP6). Las proteínas estructurales son encontradas dentro de las partículas virales y las no estructurales se encuentran dentro de la célula infectada [1]. Un resumen de las diferentes proteínas del Rotavirus está en la tabla 1.



Tabla 1. Propiedades de las proteínas constituyentes del Rotavirus

Seg. Genoma	Proteína	Localización	Características y Función
1	VP1	Core	Posible ARN polimerasa, unión al ARN de simple cadena (ssRNA), unión a VP3
2	VP2	Core	Proteína más abundante de la nucleocápside, y constituye la capa más interna del virus. Función que podría estar relacionada con el empaquetamiento de los ARNs virales dentro de la nucleocápside. Requerida para la actividad replicasa de VP1
3	VP3	Core	Actividad de guanilil-transferasa del ARN viral, Tiene una alta afinidad por ARN de cadena sencilla, componente esencial de los complejos de transcripción y no de los complejos replicativos
4	VP4	Cápside externa	Hemaglutinina, antígeno neutralizante, potenciación infectividad por proteasa, funciones esenciales en el ciclo replicativo incluyendo la unión al receptor y la penetración a la células, determinantes importantes del rango de huésped, virulencia, tropismo, e inducción de inmunidad protectora.
5	NPS1	No Estructural	Básica, anillo de zinc, alta afinidad unión al ARNs
6	VP6	Cápside interna	Proteína más abundante del virión, altamente antigénica, inmunogénica y estable, blanco antigénico de los ensayos de diagnóstico inmunológico. Posee epítopes conservados entre cepas del grupo A llamados epítopes de grupo y los llamados epítopes de subgrupo, los cuales son utilizados como para clasificar diferentes cepas dentro del grupo A. Figura 1(B)
7	NSP3	No Estructural	Dimérica, unión extremo 3' del mRNA viral, inhibe traducción del huésped
8	NSP2	No Estructural	Proteína de pH Básico, oligomérica, unión al ARNs, interacciona con VP1 y NSP5, actividad de nucleósido trifosfatasa.
9	VP7	Cápside externa	Glicoproteína altamente inmunogénica e inductora de anticuerpos neutralizantes, responsables de los primeros contactos con la célula huésped y por lo tanto tienen funciones determinación del rango de huésped, unión y penetración a las células. Figura 1(B)
10	NSP4	No Estructural	Primera enterotoxina viral, responsable de inducir salida aumentada de fluido y electrolitos de las células de las criptas intestinales.
11	NSP5	No Estructural	Básica, fosfoproteína, unión al ARN, proteína quinasa, interacción con NSP2 translocación de las partículas virales en formación desde el viroplasma hacia el retículo endoplasmático.



1.1.5 Clasificación del Rotavirus.

Los Rotavirus presentan una serología compleja y se clasifican en serogrupos, subgrupos y serotipos G y serotipo P según sus características serológicas. Se conocen 7 diferentes serogrupos o grupos dependiendo de los diferentes epítomos presentes en la proteína VP6 y VP2, a cada uno de los cuales se le ha asignado una letra: los grupos A, B y C han sido aislados tanto en humanos como en animales, mientras que los grupos D, E, F y G han sido sólo aislados en animales [7]. Con fines epidemiológicos, dentro del grupo de rotavirus A se han definido diferentes subgrupos (SG) atendiendo a la presencia o ausencia de distintos tipos de epítomos inmunoreactivos frente a determinados anticuerpos monoclonales. Se conocen el SG I, SGII, SG I+II, SG no-I y SG no-II según sean reactivos o no a los anticuerpos monoclonales de determinantes antigénicos localizados en VP6 [9]. El SG II es el más frecuente entre las cepas humanas [10, 11, 12], mientras que el SG I es más frecuente entre las cepas de origen animal [13, 14].

Ensayos de neutralización han desenmascarado la existencia de dos proteínas externas de la cápside, altamente reactivas frente anticuerpos neutralizantes de la infección: las proteínas VP7 y VP4. El hecho de que los genes que codifican para ambas proteínas puedan segregarse independientemente da la posibilidad de la existencia de antígenos de neutralización heterólogos [15].

Así, la clasificación de los Rotavirus es un sistema binario que distingue distintos serotipos de las proteínas VP7 y VP4 [16, 17, 18]. Por el momento se conocen 15 serotipos de VP7 y 13 serotipos de VP4 [18, 19, 20]. Dado que VP7 es una glicoproteína, el serotipo VP7 también es conocido como G-serotipo o G-tipo. En el caso de VP4, debido a que es una proteína sensible a proteasas, se le denomina P-serotipo o P-tipo [21]. En contribución a una mayor complejidad de la serología de los Rotavirus, tanto el VP4 como el VP7 contienen epítomos neutralizantes específicos de serogrupos y heterotípicos. En el caso de la VP4, los epítomos específicos de serotipo se encuentran sobre todo en el dominio variable de hemaglutinación VP8*, situado en los ápices de las espículas, mientras los epítomos heterotípicos se sitúan de forma fundamental en el dominio menos variables, que constituyen el cuerpo de las espículas [9].

La secuencia del segmento genómico que codifica VP7 predice fielmente el serotipo G, de manera que el genotipo constituye en la práctica un sustituto de la determinación del serotipo G. Para el caso de los serotipos P los reactantes inmunológicos que posibilitan los diferentes serotipos P son limitados y la obtención de los mismos se hace complicada por la reactividad cruzada entre



distintos serotipos P. Así que llegó la necesidad del estudio de sus propiedades basándose en la secuencia nucleotídica del gen que codifica para ésta. Por ello se utiliza más a menudo el genotipo P en la clasificación. Se ha identificado hasta la fecha 26 genotipos P [22]. Al contrario de los serotipo G algunos serotipo P comprenden más de un genotipo P. Todo esto ha llevado a una nomenclatura consenso entre la mayoría de autores para definir los serotipos de un determinado aislado de Rotavirus. Se describe el G-tipo como G y el número de G-tipo, y el P-tipo como P y el número de serotipo y/o el número de genotipo correspondiente entre corchetes. Por ejemplo, la cepa de rotavirus Bovino Lincoln sería G6 P6[1].

1.1.6 Ciclo Replicativo

La mayoría de estudios del ciclo biológico de Rotavirus se han llevado a cabo utilizando monocapas celulares a partir de células de riñón de mono y células epiteliales intestinales polarizadas humanas, aun siendo los enterocitos diferenciados del intestino delgado el tropismo celular natural de los Rotavirus. En líneas generales, la mayoría de las cepas virales requieren la adición de proteasas exógenas en el medio de cultivo para activar la infectividad del virus.

El Rotavirus inicia su ciclo de infección uniéndose a un receptor localizado en la superficie celular. Luego de la unión al receptor, el virus penetra al interior de la célula y pierde la capa externa, con lo cual se activa la transcripción. Luego de la unión a un receptor celular ocurren los siguientes pasos en un transcurso de tiempo de 14 horas aproximadamente.

1. Adsorción de las proteínas externas del virión VP4 y VP7 a un receptor celular.
2. Penetración directa o por endocitosis.
3. La capa externa es removida como parte del proceso de entrada y permite activar la transcripción.
4. Producción de los ARNm virales en el citoplasma por intermedio de las DLPs.
5. Una vez el ARNm emerge de las DLPs, el ARN de polaridad positiva es sintetizado por la ARN polimerasa viral. La función de los transcriptos es doble: por un lado producir proteínas y, por otro lado, actuar de molde para producir las cadenas negativas de ARN [21].



6. Simultáneamente el ARNm es usado como molde para la traducción de 6 proteínas virales estructurales y 5 proteínas no estructurales.
7. Ensamblaje de la capa que contiene VP1, VP2, VP3 y 11 segmentos de ARN simple hebra (ARNsh), formación de agregados de DLPs en una estructura electrodensa llamada viroplasma, en la cual también se encuentran otras proteínas no estructurales como ser: NSP2 y NSP5.
8. Las células no tienen enzimas para replicar el ARNdc, por tanto, el virus debe suministrar las enzimas necesarias. Una vez sintetizada la cadena negativa queda asociada a la cadena positiva usada como molde. Los segmentos de ARNdc se forman en el interior de las partículas virales inmaduras. No se ha encontrado ARNdc o ARN monocadena de polaridad negativa libre en el interior de las células infectadas.
9. Maduración de los DLPs a TLPs:
 - a. Glicosilación de VP7 en el retículo endoplasmático rugoso (RER), NSP4 actúa como un receptor intracelular para DLPs.
 - b. Envoltura transitoria de las partículas en el RER que contienen VP4 y VP7, adquiriendo las proteínas de la cápside más externa.
 - c. Remoción de la envoltura.
10. Liberación de partículas infecciosas. Las células infectadas crecidas en monocapa lisan para liberar la progenie viral. En el caso de enterocitos polarizados, la replicación viral altera la función celular y el virus es liberado mediante un transporte vesicular que no muestra un efecto citopático evidente [23].



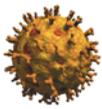
1.2 ROTAVIRUS BOVINO

La diarrea neonatal es uno de los síndromes de enfermedades importantes que afectan a los terneros en diferentes países del mundo y es una causa de importantes pérdidas económicas. La diarrea se define como una etiología multifactorial compleja, influida por factores infecciosos, nutricionales y ambientales, así como prácticas de manejos [24, 25, 26]. Entre estos factores, los agentes etiológicos son considerados agentes causantes de primer grado de este síndrome [25, 27]. El Rotavirus Bovino (RVB) es uno de los principales agentes etiológicos de estas diarreas neonatales en bovinos y otras especies animales. [28, 29, 30].

En 1969, el RVB fue el primer rotavirus grupo A en ser aislado en cultivo celular, que se caracterizó, y que se confirmó como causa de diarrea en terneros [31, 32]. Estudios posteriores demostraron la amplia prevalencia de este virus en infecciones en animales jóvenes, incluyendo los terneros y cerdos, y su asociación con el complejo de la enfermedad diarreica en los animales menores a 1 mes de edad [33].

Con respecto a los serotipos y genotipos de las cepas de RVB pertenecientes al grupo A podemos mencionar que los más predominantes son para la glicoproteína VP7: el serotipo G6 y el G10; para la proteína sensible a proteasas VP4: P6 [1], P7[5], P8[11]. Estos serotipos al combinarse, corresponden con los genotipos NCDV (neonatal calf diarrhea virus), UK (United Kingdom) o B223 de cepas de RBV respectivamente [34]. El serotipo G8 también es comúnmente encontrado entre las cepas de RVB [36, 37] y ha sido reportado en Europa y Japón [36].

La cepa de RVB, *Wistar Calf 3* (WC3) la cual es la cepa de trabajo base de este proyecto de tesis, fue aislada en 1981 a partir de un ternero con diarrea en la ciudad de Chester, Pensilvania. Fue adaptada al crecimiento celular a través de 12 pases consecutivos en células de riñón de mono verde africano, conocida como línea VERO (CV-1), en el instituto *Wistar*, en Filadelfia (de allí proviene su nombre) por H. Fred Clark [39]. La misma pertenece al serogrupo A, subgrupo SGI y al serogenotipo G6 P7[5] [34, 9]. Estudios realizados anteriormente, del análisis comparativos de la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia genética de la WC3, sugieren que la proteína VP4 de esta cepa, esta cercanamente relacionada con el prototipo de P7[5] perteneciente a la cepa UK. Adicionalmente, la proteína G del VP7 es muy similar a la G6 de las cepas NCDV y UK. Por otro lado, la proteína NSP4 está más cercanamente relacionada con la cepa NCDV de prototipo P diferente (P6[1]), que con la cepa UK, la cual posee el mismo prototipo P (P7[5]) a la WC3 [34].



1.2.1 Epidemiología del RVB

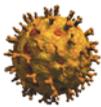
El RVB está presente en la mayoría de los rebaños de ganado y por lo general causa diarrea en los terneros desde las 12 horas post-parto hasta los 2 primeros meses de vida y la edad de máxima susceptibilidad se registra entre los 2 y 19 días de edad [38]. La diarrea se desarrolla dentro de un corto período de incubación entre 18-24 horas posteriores a la inoculación oral. Se caracteriza por heces acuosa amarillenta, de olor característico, no enterocolítica y no hemorrágica, que en casos extremos y en combinación con infecciones bacterianas secundarias puede llevar a cuadros graves de deshidratación y muerte. Otros síntomas clínicos pueden ser depresión, anorexia y deshidratación.

La enfermedad clínica en terneros de más de un mes de edad es poco frecuente. Sin embargo, re-infecciones periódicas asintomáticas con excreción viral a través de las heces durante varias semanas se produce en vacas y en vaquillonas, por lo que se considera al animal adulto como fuente de infección principal para los recién nacidos. Rotavirus tiene alta resistencia ambiental y con cada gramo de materia fecal diarreica se eliminan unos 100.000 millones de partículas víricas. La edad del animal, el estado inmunitario de la madre, categoría de la madre (vaca o vaquillona), la absorción de anticuerpos calostrales, el grado de exposición viral, la temperatura ambiental y la presencia de otros enteropatógenos son factores que influyen en la infección y su gravedad clínica de la enfermedad [38].

Una característica epidemiológica importante es que la protección contra la enfermedad depende de la presencia de anticuerpos calostrales específicos en la luz intestinal del neonato, el efecto protector del calostro dependerá del título de anticuerpos que este posea y de la cantidad de este elemento que ha ingerido el ternero en las primeras 24 horas de vida. La protección es contra la enfermedad clínica y no necesariamente contra la infección [38].

Las pérdidas económicas que se producen son debidas a la falta de peso, retraso del crecimiento, y a una no bien determinada tasa de mortalidad. Los porcentajes de mortalidad promedio oscilan desde el 3.6% en Francia y el 10% en Estados Unidos sin embargo pueden superar el 10% en establecimientos individuales [40]. Los altos costos que implicarían su tratamiento y control, se ha calculados unos 33.46 US\$ por ternero por año de perdidas [40].

Estudios realizados en el Instituto de Virología del INTA en Argentina, durante los años (1992-1999) indican que el RVB representan uno de los principales



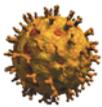
agentes etiológico de enfermedades entéricas en terneros neonatos, alcanzando una prevalencia del orden del 87% en rodeos de cría y del 74% en establecimientos de tambo [37]. Una diferencia de la distribución clara de los genotipos G y P tipo se encontró según el tipo de ganado. G6P[5] fue la cepa prevalente en hatos de carne, mientras que P[11] fue el predominante de tipo P en los hatos lecheros (71%), asociadas en proporciones similares con G6 y G10 [41].

Con respecto a Uruguay son pocos los datos existentes referentes a la incidencia y prevalencia de diarrea en terneros neonatales generada por RVB, así como lo relativo a las pérdidas económicas que ocurren en la producción ganadera debido a esta enfermedad. Sin embargo recientemente se llevo a cabo un estudio realizado por equipo de Virología de la Facultad de Ciencias, el cual comprendía un relevamiento a nivel epidemiológico de las cepas circulantes en el país en un período de tiempo acorde con los brotes de RVB. Como resultado se detectó por primera vez en el país la circulación de cepas de RVB con genotipos G6 P[11], y G10P[11] [42].

1.2.2 Patogenicidad del RVB

Los virus entéricos que producen diarrea se pueden clasificar de acuerdo a sus sitios de replicación, vertical y longitudinal, en regiones el tracto intestinal [43]. El RVB y Coronavirus pertenece a los tipos de virus que infecta las células epiteliales de las vellosidades, que por lo general no causan infecciones sistémicas. En contraste, los virus como Parvovirus y Diarrea Viral Bovina (DVB) infectan principalmente los enterocitos de las criptas y las células linfoides intestinales y por lo general causan infecciones sistémicas [43].

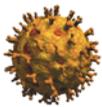
El proceso por el cual un virus enteropatógenos como RVB causas lesiones intestinales diarreicas puede explicarse por etapas [44]. La principal vía de transmisión, es la vía fecal-oral, resultando en la infección directa de las células epiteliales de la superficie de las vellosidades del intestino delgado a través de la superficie luminal de los enterocitos maduros, seguido por la internalización de los virus [45, 46]. Figura 2. Entre las explicaciones de este proceso de internalización, se pueden mencionar el papel de los receptores celulares y las diferentes enzimas intestinales sobre las células epiteliales enzimáticamente maduras de los bordes en cepillo que constituyen las microvellosidades. Estas enzimas pueden ser necesarias para la activación viral o exposición de receptores por parte de la célula, de manera similar a la necesidad de uso de enzimas como tripsina, quimiotripsina o pancreatina para la replicación del rotavirus in vitro [45, 46], en cultivo celular.



Además, en el recién nacido, algunos virus pueden ser ingresado por vía de la pinocitosis durante el período de adsorción de calostro en células epiteliales inespecífica de las vellosidades [43]. Los virus infectan y destruyen las células epiteliales de superficie de las vellosidades, resultando en la atrofia de las mismas. Esto conduce al síndrome de mal absorción típica de estas infecciones virales diarreicas.

El rotavirus infecta principalmente las células de la mitad apical de las vellosidades (células más enzimáticamente maduras), lo que produce una leve y transitoria diarrea (a diferencia del Coronavirus que produce una atrofia celular y una diarrea más pronunciada). Las células epiteliales en las puntas de las vellosidades constantemente están siendo reemplazadas por células que proliferan en las criptas y migran hacia los lados de las vellosidades. Las células cuboidales inmaduras y secretorias de la cripta, son incapaces de cumplir con las funciones normales de digestión y absorción, por lo que disminuye el transporte de glucosa asociado al sodio, se registran niveles anormalmente bajos de maltasa, sacarosa y lactasa. La mayoría de los individuos con gastroenteritis aguda por RVB padecen mala absorción de lactosa e intolerancia. La lactosa de la leche no digerida favorece el desarrollo bacteriano y ejerce un efecto osmótico que contribuye al desarrollo de la diarrea. La lesión se regenera entre 4 a 6 días después de instalada la diarrea. [40]. En los animales más jóvenes o en animales gnotobióticos, es más lenta reparación de atrofia de las vellosidades, lo que puede contribuir a la mayor susceptibilidad de los recién nacidos a las diarreas virales. Los terneros suelen necesitar 2 a 3 semanas para recuperarse y recobrar un ritmo de crecimiento normal. El aumento de la frecuencia en la sustitución de las células epiteliales de las vellosidades y la pérdida de la capacidad de absorción de macromoléculas como las inmunoglobulinas (Igs) del calostro están relacionadas con la edad, factores que pueden aumentar la resistencia de los animales más viejos a estos virus enteropatógenos [42].

La sustitución constante de células epiteliales de las vellosidades dañadas por células originarias de la criptas, que además que son refractarios a los rotavirus [47, 42], sugiere que en la mayoría de los animales estas infecciones son auto-limitadas, exceptos en aquellos casos donde la infección es múltiple (Rotavirus y DVB o parvovirus), donde la morbilidad y mortalidad de estos casos son aumentados. La detección de varios virus de una sola muestra diarreicas de ternero es común [48, 49, 50, 43]. Propiedades tales como estabilidad a pH bajo (3 – 4) y en presencia de enzimas proteolíticas permiten que estos virus funcionen bien en el ambiente intestinal.



Rotavirus en general se replican en la parte distal del intestino delgado [43]. Sin embargo estudios recientes observaron que la replicación viral se extiende uniformemente a lo largo de todo el intestino delgado afectando principalmente el extremo proximal, en terneros muy jóvenes, mientras que los terneros de más edad (10 días de nacido) presentaron la infección en la zona media y distal. Otro hallazgo importante fue la detección de presencia de enterocitos infectados por RVB en el ciego y el colon independientemente de la edad, indicando que la infección puede extenderse al intestino grueso, al menos en Bovinos [40].

En cuanto al tropismo celular, las razones por las predilecciones para algunas regiones del intestino no están claras. Los factores fisiológicos tales como las concentraciones de enzimas diferentes, pH, y la presencia de sales biliares, pueden jugar un papel importante. Factores inmunológicos, tales como variaciones regionales en las concentraciones locales anticuerpos, inmunidad mediada por células o interferón también pueden influir en la replicación viral intestinal [43]. Diferentes cepas de RVB pueden diferenciarse en el nivel de infección, en la distribución, y en la gravedad del daño al intestino delgado.

En casos de infecciones con virus atenuado (vacunación a virus vivo modificado) el número de enterocitos afectados es mucho menor en comparación con la cepa parental virulenta, en un tiempo determinado, además que el nivel de alteración del enterocito no es suficiente para causar daño a la mucosa afectada.

Por otro lado tenemos que la proteína NSP4 actúa en los estadios tempranos de la infección viral, promoviendo la movilización de Ca^{2+} hacia el interior de los enterocitos infectados con la consiguiente secreción de fluidos que provoca la alteración del balance hídrico y electrolítico [40]. También se postula que la infección por RV produce la activación de terminales nerviosas en la pared intestinal generando un aumento del peristaltismo y de la secreción de agua fomentando la diarrea acuosa [40].

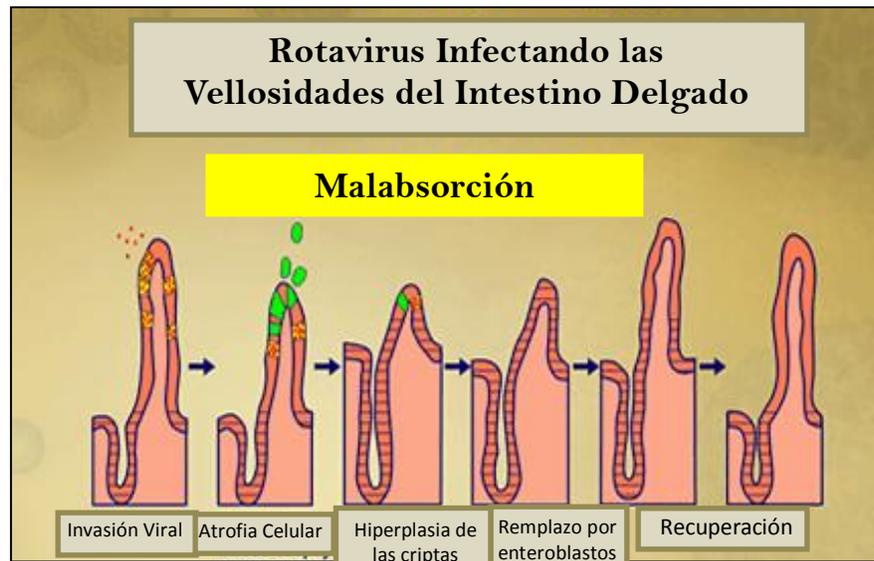
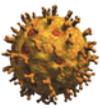


Figura 2. Diagrama esquemático de la invasión del virus a las vellosidades intestinales y su efecto en las células infectadas., la muerte celular, y la atrofia, se puede observar la disminución del tamaño de las vellosidades y redondeamiento. Adaptado de: Desselberger, 2006 [51].

1.2.3 Inmunidad pasiva en el tracto intestinal en Terneros

El sistema inmune del ternero se forma en las fases tempranas del desarrollo fetal. A pesar de que el periodo de gestación del bovino es de 280 días, se ha descrito que los terneros fetales pueden responder al RVB al día 73 de gestación, ya para ese tiempo se han formados órganos linfoides como el timo, la medula ósea, bazo y los nódulos linfáticos [52]. Así que los linfocitos de la sangre fetal pueden responder a los antígenos, así como también los neutrófilos y el sistema de complemento, pero esta capacidad se pierde temporalmente en el momento del parto, como resultado de los altos niveles séricos de esteroides [52].

Por otro lado, el ternero al nacer posee niveles de gammaglobulinas muy bajas, debido al tipo de placentación de la especie, la cual se clasifica en sindesmocorial. Este tipo de placenta no permite el paso de inmunoglobulinas maternas al feto durante la gestación como ocurre en otras especies (porcinos, caninos, primates etc.), debido que el epitelio coriónico está en contacto directo con los tejidos uterino

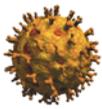


[53, 52]. En los animales con este tipo de placenta la adquisición de la inmunidad pasiva depende totalmente de los anticuerpos recibidos a través del calostro [52].

Este calostro contiene las secreciones de la glándula mamaria acumuladas durante las últimas semanas de gestación, así como proteínas transferidas activamente desde la circulación sanguínea bajo la influencia de los estrógenos y progesterona [52].

Los bovinos poseen tres subclases de IgG: IgG1, IgG2 e IgG3. La IgG1 representa alrededor del 80% de la IgG del suero y es la inmunoglobulina predominante en las secreciones mamarias, a diferencia de otras especies como en los primates, donde predominan las IgA [52]. Todas las IgG, la mayoría de IgM y 40% de las IgA preceden de la transferencia a partir de la sangre de la vaca en el calostro. Por el contrario en la leche, solo 30% de la IgG y el 10% de las IgA tiene este origen, el resto se produce localmente por el tejido linfoide de la ubre. El calostro bovino también tiene cantidades significativas de Interleucina (IL) 1 β , IL-6, factor de necrosis tumoral α e Interferón γ . Se ha informado que estas moléculas poseen propiedades inmunomoduladoras que influyen en la inmunidad neonatal, estimulando la producción de citoquinas, proliferación de las células B proliferación, la promoción y maduración de la respuesta inmune de la mucosa neonatal [54, 55].

La cantidad promedio de calostro que ingiere un ternero es de 2 litros diarios. Las inmunoglobulinas calostrales se absorben en el intestino delgado por el proceso de micropinocitosis en las células cilíndricas del epitelio, su transporte y absorción de a través del enterocito se lleva a cabo por medio de vacuolas que llegan a los vasos linfáticos, de ahí pasan al conducto torácico y posteriormente a la sangre. El periodo máximo de absorción de inmunoglobulinas calostrales se produce durante las primeras 6 a 8 horas de vida. Ya 24 horas post nacimiento las células epiteliales de tipo fetal han sido reemplazadas en su totalidad por células incapaces de absorber inmunoglobulinas. La desaparición de la permeabilidad intestinal a las inmunoglobulinas calostrales se acelera después de 12 horas de nacido. Junto con las inmunoglobulinas se absorben otra serie de proteínas como las globulinas séricas bovinas, albúmina, polisacáridos de alto peso moléculas, vitaminas, minerales y otros constituyentes del calostro. En bovino a diferencia de otras especies, la absorción de Igs no es selectiva, todas Igs calostrales son absorbidas. En general la IgA es la inmunoglobulina que se encarga de los mecanismos de defensa de las mucosas, pero los niveles de IgA sintetizadas en la glándula mamaria son muy bajos por lo que esta función la desempeña la IgG. Por ende, la IgG es considerada la más importante en la inmunización pasiva de los terneros [56].



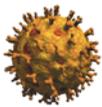
El calostro puede aportar a través de la inmunidad pasiva niveles de IgG séricas aproximados a los que se encuentran en el adulto. Un buen calostro tendrá una concentración de anticuerpos de 50 a 123 mg/mL, y donde la concentración ideal de inmunoglobulinas debe ser de 80 mg/mL para asegurar la adecuada transferencia pasiva [53].

Por otro lado el calostro también contiene linfocitos. Para el calostro bovino se ha calculado la presencia de 1×10^4 linfocitos/mL de los cuales la mitad son linfocitos T. Estas células pueden sobrevivir hasta 36 horas en el intestino de los terneros recién nacidos y algunos penetran la pared intestinal a través del epitelio de las placas de Peyer y llegar hasta los nódulos linfáticos mesentéricos [52]. Se ha demostrado claramente que la ingestión de leucocitos calostrales maternos inmediatamente tras el nacimiento, estimula el desarrollo del sistema inmune del recién nacido. Por el contrario en la leche generalmente, hay muy pocos leucocitos, otro motivo que se suma a la importancia del consumo de calostro por parte del ternero neonato.

Las Fallas en la transferencia pasiva, puede ser causada por factores como calostro de baja calidad, falta de instinto materno, mala conformación de la glándula mamaria, debilidad, hipotermia o traumatismos en el ternero, factores que provoquen estrés en la madre y el feto como la aplicación de corticosteroides de acción prolongada para inducir el parto, terneros prematuros, temperaturas ambientales marcadas [52]. La prevención de infecciones localizadas en tracto intestinal, requieren de la presencia de suficientes niveles de anticuerpos en el sitio de unión, replicación e invasión del patógeno (luz intestinal). Por ello una transferencia óptima de la inmunidad pasiva, desempeña un papel fundamental en la protección y prevención contra esta enfermedad.

En terneros con niveles séricos elevados de IgG1, el curso clínico de la diarrea como respuesta a un desafío con RVB, es significativamente menor en comparación con terneros con bajos niveles de IgG1 en suero [58]. Por otra parte, se ha observado una correlación inversamente proporcional entre el título de Ac neutralizantes específicos contra RVB en suero adquiridos pasivamente y el desarrollo de diarrea por RVB [58].

Los anticuerpos maternos ingeridos, contribuyen tanto en la inmunidad local como en la inmunidad sistémica en bovinos. Esto es debido a que en esta especie no ocurre el estricto efecto protector local en la luz intestinal de los anticuerpos maternos, como ocurre en otras especies y en el humano [57]. Estudios en terneros han sugerido que las IgG1 calostrales absorbidas, se movilizan desde el



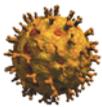
suero y vuelven a la luz intestinal [60, 38], complementando el papel de los anticuerpos de la leche en la inmunidad pasiva contra BRV. Se ha determinado [57, 59, 38, 60], que cuando los títulos de anticuerpo pasivos circulantes son altos en el ternero, la transferencia de estos desde el suero al lumen intestinal es suficientemente eficiente para mediar al menos una protección parcial contra la diarrea por rotavirus. Este autor también indica que la principal vía de eliminación de los IgG1 adquiridos pasivamente en terneros es la transferencia suero – luz intestinal. Aproximadamente el 70 % de esta inmunoglobulina es eliminada por esta ruta [57].

Cabe mencionar que la vacunación de las hembras preñadas es uno de los principales manejos para lograr alcanzar una adecuada inmunidad pasiva en los terneros neonatos. Aparte de la vacunación de las madres, existe otro manejo sugerido para la prevención de infecciones gastrointestinales como el RVB. Este se basa en la administración de leche suplementada con calostro inmune a RVB proveniente de madres vacunadas con 2 o 3 dosis, durante los primeros 14 días de vida del ternero, ya que esta induce altas tasas de protección contra la diarrea durante el período pico de susceptibilidad a la infección de BRV y una modulación positiva de la respuesta inmune neonatal hacia un mayor número células productoras de IgA y mayor diversidad de isotipo en la mucosa intestinal [84].

1.3 Vacunas Veterinarias Generalidades

La vacunación contra las enfermedades infecciosas ha sido una práctica común durante más de 200 años y ha contribuido a disminuir el sufrimiento animal y las pérdidas económicas debido a las infecciones bacterianas y virales, mas que cualquier otro tratamiento profiláctico y acciones terapéuticas combinadas. Sin embargo, a pesar del éxito, las enfermedades infecciosas continúan teniendo gran importancia económica en todas las áreas del mundo [57].

Las vacunas que se utilizan actualmente en el mercado se elaboran según métodos convencionales. Estos incluyen las vacunas vivas atenuadas que emplean cultivos "in vitro" para seleccionar mutantes con reducida capacidad de causar enfermedad pero que pueden aun replicarse de algún modo en el animal. El mayor problema en el desarrollo de vacunas atenuadas es el nivel de atenuación y la potencial reversión de la virulencia. Actualmente la atenuación se logra por pasaje del agente "in vitro" ya sea en presencia de agentes mutagénicos o bajo condiciones de cultivo diversas. Luego de un número de pasajes las variantes generalmente se seleccionan según su crecimiento en los medios de cultivo pero reduciendo la virulencia en el animal.



Como estas vacunas pueden reproducirse "in vivo", es fundamental monitorear el nivel de atenuación. Una sobre atenuación puede limitar la replicación y en consecuencia limitar la protección contra la cepa de desafío. En contraste, una baja atenuación puede resultar en enfermedad clínica.

Un segundo grupo de vacunas comerciales utilizadas hoy en día son las vacunas inactivadas, donde el patógeno de interés crece en grandes cantidades y luego se inactiva por algún método que previene la multiplicación del mismo pero sin alterar sus propiedades antigénicas. Cada una de estas vacunas tiene ventajas y desventajas. Debido a esto, y a que ninguna de ellas es 100 % efectiva, es que se hacen enormes esfuerzos para desarrollar nuevos productos, más seguros y eficaces.

Para las vacunas inactivadas, existen diferentes compuestos químicos que se han usado como inactivantes entre ellos se pueden mencionar el formaldehído, fenol, Beta propiolactona, (BPL) etc. Tales compuesto han presentados ciertas desventajas en proceso de inactivación viral para vacunas veterinarias a lo largo de la historia, por ejemplo el formaldehído no genera una reacción de inactivación lineal y extensos periodos de proceso son requeridos. Además de esto los ácidos nucleicos permanecen funcionales, siendo factible una inactivación viral incompleta. La BPL es un compuesto de aziridina, el cual funciona a través de la alquilación de ácidos nucleídos e inhibiendo la replicación [61]. Estos tipos de compuestos son también usados en terapia anti cancerígenas. Una de las principales desventajas presentada por este compuesto fue reaccionar con varios aminoácidos, lo cual podría afectar la inmunogenicidad de las proteínas de superficie y los epítopes presentados.

Actualmente se está usando inactivantes de primer orden, que ofrecen mayor garantía de inactivación. Un inactivante de primer orden es aquel que presenta una cinética de inactivación constante durante todo el proceso, no es afectado ni por los tiempos ni por los componentes del medio. Entre los inactivantes de primer orden encontramos al (Etilenimina binaria) BEI [62].

El BEI al igual que la BPL, es un compuesto de aziridina. A pesar que con el BEI se puede observar cierta reacción con las proteínas, el impacto sobre la conformación de los epítopes y su accesibilidad es sustancialmente menor que con los tratamientos de BPL o formaldehído. Casi no existe efecto significativo sobre las proteínas superficiales de los virus [61].

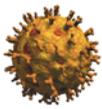
Después de la inactivación del organismo, se puede inactivar el propio BEI mediante la adición de un reactivo adecuado que convierta el BEI en una forma en la que este se pueda manejar de forma inocua. Los ejemplos de agentes inactivantes



adecuados incluyen tiosulfato de sodio que inactiva el BEI mediante la apertura de la estructura de anillo del compuesto y ácido cítrico. En ausencia de un ajuste adicional, el pH del medio de cultivo tiende a hacerse más ácido en el tiempo. Conforme a esto, el pH del medio de cultivo se debe controlar continuamente durante el proceso de inactivación y mantener en el nivel ligeramente alcalino deseado mediante la adición de base adicional cuando se requiera.

Por otro lado, un problema general observado con el uso de vacunas inactivadas es su incapacidad para provocar una respuesta inmune que sea suficiente para la protección. Por consiguiente, las vacunas inactivadas son combinadas a menudo con un adyuvante, un compuesto o composición que sea capaz de aumentar la respuesta inmune general o específica en el sujeto vacunado. La administración de microorganismos inactivados, o componentes de los mismos, y el adyuvante conduce a una respuesta inmune fuerte, eficaz y generalmente protectora. [61]. Un adyuvante mejora principalmente los resultados de la respuesta inmune innata, pero debido a los diversos mecanismos y vínculos que existen entre la respuesta inmune innata y la adaptativa, esta mejora conlleva en sí, a una mejora de la respuesta inmune adaptativa en general. Se ha observado que los adyuvantes pueden ejercer sus efectos aumentando la inmunidad en cinco actividades que son las siguientes:

- En primer lugar, los adyuvantes ayudan al transporte de los antígenos a los ganglios linfáticos donde pueden ser reconocidas por las células T. Esto conlleva a una mayor actividad de las células T, resultado una mayor eliminación de patógenos en el organismo.
- En segundo lugar, los adyuvantes proporcionan protección física a los antígenos, lo que garantiza la liberación antigénica por tiempo prolongado al organismo, lo que permite que el sistema inmunológico se haga más eficiente, ya que utiliza el tiempo adicional para aumentar la producción de células B y T necesarias para mejorar la memoria inmunológica en la respuesta inmune adaptativa.
- En tercer lugar los adyuvantes, provocan un proceso inflamatorio y activan células presentadoras que liberan citoquinas y mejoran la presentación de los antígenos vacunales a las células T
- En cuarto lugar, inducen la liberación de citoquinas proinflamatorias producidas por las células presentadoras activadas lo que produce un buen reclutamiento de células efectoras B y T. También favorece al aumento de



los acontecimientos de la transcripción que conducen a un aumento neto de las células inmunes en su conjunto.

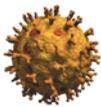
- Por último, los adyuvantes se cree que aumentan la respuesta inmune innata contra el antígeno mediante la interacción con los receptores de reconocimiento de patrones (RRP), específicamente los receptores tipo Toll (TLR), en las células del sistema inmunitario innato [65].

Los adyuvantes más ampliamente utilizados en las vacunas veterinarias son las emulsiones de aceite mineral y los adsorbentes (hidróxido y fosfato de aluminio). Los primeros estudios acerca del modo de acción de los adyuvantes de aluminio, evidenciaron la formación de un depósito en el sitio de la inyección, donde el antígeno es liberado lentamente. Investigaciones más recientes sugieren que el antígeno soluble atrapado en el gel permite prolongar el tiempo de interacción entre él, las células presentadoras de antígenos (CPA) y los linfocitos. El mecanismo de acción también abarca la estimulación de células inmunocompetentes a través de la activación del complemento, la inducción de eosinofilia en el sitio de inyección la activación de macrófagos y la toma eficiente de partículas de antígeno por las CPA dada su naturaleza particulada y su tamaño inferior a 10 mm. El hidróxido de aluminio es el único adyuvante permitido en vacunas humanas [64].

Aunque los efectos colaterales son relativamente pocos, entre las limitaciones se encuentran: la generación de reacciones locales, la producción de anticuerpos de tipo IgE y la falta de efectividad para algunos antígenos [63].

Con respecto a lo adyuvantes oleosos, estos permite la liberación y degradación más lenta del antígeno al localizarlo en el sitio de inoculación. Esta localización del antígeno, induce una reacción inflamatoria que a su vez promueve su retención. La absorción retardada del mismo hace que esté disponible para estimular el sistema inmune durante más tiempo, aumentando la respuesta de anticuerpos como resultado de estimulaciones secundarias sucesivas. Se obtiene así una alta concentración de anticuerpos durante un lapso más extendido. Existen varios tipos de emulsiones, aceite en agua o agua en aceite, y la doble emulsión.

Generalmente, las emulsiones agua en aceite (*Water/oil*, W/O) se recomienda para los bovinos, pequeños rumiantes, aves de corral y peces cuando se requiere inmunidad a largo plazo. En el caso de la fiebre aftosa, emulsiones en base de aceite mineral puede proteger a los bovinos 1 año con una sola vacunación, mientras que las formulaciones sobre la base de hidróxido de aluminio requieren dos o más revacunaciones. La W/O permite la reducción de la dosis vacunal o la reducción de la concentración del antígeno, lo cual es importante por la rentabilidad que deben



tener las vacunas. También puede aumentar la respuesta inmunitaria celular. Diversos estudios de vacunación en ratones contra virus, bacterias u antígenos parasitarios, han demostrado que la emulsión W/O induce mayores niveles de anticuerpos IgG2a que otros tipo de emulsiones. Por último, la emulsión W/O es capaz de inducir una respuesta protectora de células T citotóxicas [64].

Las emulsiones de aceite mineral, especialmente las del tipo agua en aceite, si bien inducen una fuerte respuesta inmune, pueden provocar riesgos y efectos no deseados, a causa posiblemente de su limitada biodegradabilidad y biocompatibilidad. Pueden dar lugar a inflamación local y reacciones granulomatosas en el sitio de la inyección. Si se utiliza incorrectamente o en exceso puede causar efectos secundarios significativos, como la inflamación crónica, ulceración de la piel, absceso local o desprendimiento de tejidos. Acciones como utilización de una técnica estéril en la preparación de la mezcla adyuvante antígeno; b) la preparación aséptica del sitio de la inyección; c) apropiados técnica de inyección; d) selección apropiada de las vías y los sitios de la administración, e) y el uso de volúmenes más pequeños en cada lugar de la inyección han sido eficaces en la eliminación de las complicaciones post-vacunación mencionadas anteriormente.

1.3.1 Vacunación contra RVB

Debido a la infección por RVB se localiza principalmente en el intestino delgado de terneros neonatos, las estrategias de vacunación se han centrado en métodos para inducción de inmunidad activa o pasiva en el intestino de animales susceptibles [66, 67, 68, 69].

Se han desarrollado dos estrategias para prevenir la diarrea por RVB en terneros jóvenes.

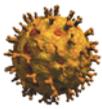
- La primera estrategia se basó en la estimulación de la inmunidad activa a través de la administración oral de vacunas vivas a virus modificados en terneros recién nacidos [66, 70 38]. Investigaciones posteriores sugirieron que bajo condiciones de campo, este tipo de estrategia vacunal tuvo fallas debido a la interferencia del desarrollo de la inmunidad activa por la presencia de anticuerpos maternos en los terneros [71, 70, 38], ya que estos interfieren principalmente con la replicación de la cepa vacunal, lo que se traduce al final en inhibición de la respuesta inmune activa, incluso en concentraciones bajas, estos anticuerpos maternos bloquean eficientemente esta respuesta [52]. La infección natural de las vacas con RVB en campo,



logra que estas puedan administrar ciertos niveles de anticuerpos anti RVB en calostro.

En resumen la presencia de estos anticuerpos en las madres y el grado de atenuación del virus necesarios para asegurar inocuidad de la vacuna a virus vivos en los recién nacidos, limitaron la viabilidad de esta estrategia. Un problema adicional es que los recién nacidos pueden estar expuestos a una cepa de campo virulenta de BRV antes de que la respuesta inmune protectora puede ser inducida por la vacuna. A esto se suma la necesidad de manejar y de vacunar a cada animal poco después de la natalidad lo que representa problemas de manejo en grandes hatos de producción de carne.

- La segunda estrategia es la vacunación parenteral de vacas preñadas para inducir inmunidad pasiva en los terneros [38]. La vacunación parenteral de madres vacunas, representa un enfoque lógico para impulsar los de anticuerpos en las secreciones mamarias y por tanto, estimular la secreción prolongada de alto título de anticuerpos en la leche. Ya que la mayoría de los animales adultos tienen anticuerpos anti-rotavirus, adquiridos mediante la inmunización natural, por lo que la vacunación facilita la estimulación inmunogénica contra RVB [72,73], ya sea tanto de las cepas que circulan de forma endémica en la región, como estimulación inmunogénica contra la cepa vacunal [74]. Bajo circunstancias ideales, un ternero podrá convertir la infección por RVB en subclínica mientras este bajo la influencia protectora de anticuerpos pasivos y mientras se desarrolla su inmunidad activa, la cual previene las enfermedades graves posteriores. Sin embargo, el equilibrio entre la inmunidad pasiva y el desarrollo de la enfermedad ha sido interrumpida por muchos aspectos de los sistemas intensivos de producción animal, como puede ser la exposición de los terneros a dosis altas de virus en ambiente limitados y contaminados, el suministro de suplementos a los terneros a una edad temprana, el destete precoz. Todos estos factores mencionados anteriormente coinciden en una disminución de la administración de los títulos de anticuerpos contra RVB durante el periodo de lactancia [38, 57].
- En 1973, Mebus y colaboradores [66], fueron los primeros en informar aumento de títulos de anticuerpos séricos contra RVB en vacas preñadas después de la vacunación por vía subcutánea (SC) o intramuscular (IM) con la cepa RVB NCDV G6P[1], inactivada con formaldehído.



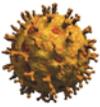
Son numerosos los estudios que se han realizado hasta la fecha sobre este tema, entre las observaciones más resaltantes podemos mencionar:

- La eficacia vacunal puede ser variable y está influenciada por numerosos factores relacionados con el huésped, la vacuna y el proceso de vacunación [57]: La Importancia de la vía de vacunación en la madre preñada: Estudios posteriores a los realizados por Mebus y colaboradores [62], confirmaron lo reportado por el autor [69, 76, 77, 78]. Los Títulos de anticuerpos contra el RVB aumentaban significativamente en suero o secreción mamaria después de la vacunación vía parenteral, (IM o SC) con vacunas inactivadas con adjuvantes o vacunas a virus vivo modificado.
- También podemos observar a través del estudio realizado por Saif y colaboradores, 1985 [59, 68, 69, 71] como la vía de administración de la vacuna influye en la respuesta inmunológica. Ellos describen un método óptimo de vacunación de vacas preñadas con la cepa RVB NCDV G6P [1] para potenciar los títulos de anticuerpos en secreciones mamaria en vacas vacunadas a nivel IM e intramamario (IMM) con vacunas a virus vivo modificado o vacuna inactivadas con etilenimina binaria (BEI) en adyuvante incompleto de Freund (IFA). Como resultados obtuvieron un marcado aumento en los títulos de IgG1 en calostros, así como un aumento aunque más moderado de los otros isotipo de inmunoglobulinas. Otro hallazgo de importancia fue que estos títulos de anticuerpos se mantuvieron significativamente elevados en la leche (en comparación con los controles) durante por lo menos 30 días después del parto. Ellos plantearon que la introducción del antígeno por dos vías de inoculación diferente se tradujo una mayor expansión de células sensibles a RVB en la glándula mamaria. Como desventaja se presenta que a pesar que la inmunización IMM puede ser aplicables en las vacas lecheras, especialmente durante el período de secado, este manejo es poco practico en el ganado de carne.
- La importancia del uso de adjuvantes: La incorporación de adjuvantes llevan a mayores los títulos de anticuerpos contra RVB en calostro asociados principalmente con IgG1, donde vacunas sin adyuvante alguno no lograr alcanzar tales niveles de anticuerpos calostrales [38].
- Importancia de la dosis vacunal y el tipo de vacuna: Tanto el título viral o la dosis vacunal así como el tipo de vacunas virus vivo modificado o inactivadas, influyen en la respuesta inmunitaria del animal Saif y Smith, 1985 [43], demostraron que una dosis de 1×10^8 Unidades formadoras de



placa (UFP) de vacuna a virus vivo modificado (VVM) de la cepa NCDV, (10.000 veces mayor que el título de rotavirus de vacunas comerciales) tuvo mejor respuesta de las respuestas de anticuerpos calostrales, contra RVB en secreciones mamarias. Además, al considerar esta dosis de virus óptima, para vacuna a VVM, en el uso de vacunas inactivadas puede ser necesario el uso de un título viral mas alto para lograr el mismo efecto que la a VVM debido a la antigenicidad de algunas proteínas virales pueden ser destruidas en el proceso de inactivación.

- Importancia de los diferentes tipos de inactivantes usados: en vacunas inactivadas el tipo de inactivante puede influir en la respuesta inmune, así tenemos diferencias en la respuesta de anticuerpos a vacunas inactivadas con BEI frente a vacunas inactivada con B-propiolactona (BPL) o formaldehído. El BEI al ser un inactivante de primer orden es muy superior a estos dos últimos. Estudios encontraron que los títulos anticuerpos calostrales fueron unas 10 veces mayor en secreciones mamarias de las vacas inmunizadas con rotavirus inactivado con BEI en comparación con las vacunadas con rotavirus inactivado con BPL [43].
- El papel de los anticuerpos a nivel de protección pasiva de los terneros frente al desafío con una cepa heteróloga no está claro. Varios investigadores [74-80] demostraron que las vacas inmunizadas con un serotipo de Rotavirus desarrollaron un aumento en el suero del título de anticuerpos neutralizantes (NA) contra la cepa de la inmunización y para otros serotipos para los que tenían títulos de NA antes de la vacunación. Es por esto que en el proceso de vacunación es importante previamente conocer los genotipos de Rotavirus Bovinos que circulan en los establecimientos de cría y de tambo de la región, para la elaboración de una vacuna acorde con las exigencias. Se ha demostrado que a nivel de NA de cobayos es muy poca o no existe protección cruzada entre diferentes genotipos de RVB [81]. En bovinos se ha demostrado a través de estudios en terneros gnotobióticos, que solo existe protección cruzada entre Rotavirus de un mismo serotipo y que con la menor diferencia entre serotipos, es suficiente para que el ternero muestre poca protección cruzada [83].
- El número de dosis vacunales que se aplica a la hembra preñada es también de vital importancia. Hay que tomar en cuenta que pocas inmunizaciones en hembras jóvenes puede llegar a no ser suficiente para lograr una adecuada protección inmunológica contra RVB, ya que la edad de la madre y el número de parto influyen en el nivel y la calidad de calostrado que le



ofrecerá esta al ternero. Esto se pudo demostrar en estudios anteriores [72, 83] donde la eficacia (como lo demuestra una disminución de la morbilidad y la mortalidad de la diarrea por RVB) de una vacuna inactivada G6 fue demostrada en hatos de carne y hatos tipo tambo, en dos grandes ensayos de campo realizados en Argentina. En el rebaño de ensayo I, hubo una disminución progresiva de la prevalencia, de la mortalidad y la morbilidad por diarrea se observó después de tres años sucesivos de la vacunación. Con Dosis repetitivas de BRV vacuna también redujo la cantidad y la duración de la excreción del virus por los terneros en el campo, reduciendo efectivamente el general los niveles de exposición en el rebaño a BRV [83]. De interés, sin embargo, que los terneros nacidos de BRV vacunados novillas (primíparas) tuvieron una mayor prevalencia y morbilidad por diarrea por BRV, comparados con los terneros nacidos de vacas multíparas vacunados. Por lo tanto, los terneros nacidos de las novillas puede ser un reservorio para infecciones por BRV en un rebaño cerrado, un procedimiento más eficaz consta de refuerzos frecuentes o mayores dosis de vacunas, para las novillas.



2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



2.1 HIPÓTESIS:

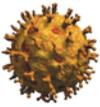
Considerando los antecedentes sobre el desarrollo de vacunas contra RBV, nos planteamos la hipótesis de la viabilidad de la primera producción para Uruguay de una vacuna inactivada contra RVB empleando una cepa de referencia (WC3) que alcance el límite de potencia satisfactorio independientemente del tipo de la formulación y de adyuvante utilizado.

2.2 OBJETIVO GENERAL:

Elaboración de formulaciones diferentes de una vacuna inactivada contra Rotavirus Bovino con la cepa WC3 (*Wistar Calf 3*) G6 P[5] y la evaluación de la eficacia de cada una de ellas, usando como modelo biológico la especie cobayo, a través de criterios de evaluación de potencia previamente establecidos en Argentina.

2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

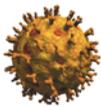
- 2.2.1 Producción de Vacuna Inactivada contra Rotavirus Bovino monovalente y polivalente, con adyuvantes de tipo Acuoso y Oleoso
- 2.2.2 Desarrollo de método para la detección de Rotavirus en las muestras de vacuna inactivada basado en la técnica de ELISA y desarrollo de métodos para la detección de Anticuerpos isotipo IgG y neutralizantes anti Rotavirus en las muestras de cobayos y bovinos basado en la técnica de ELISA y de Seroneutralización.
- 2.2.3 Estudio de la reacción cruzada entre cepas homologas a la WC3 (INDIANA G6P[5]) y cepas heterólogas (B223 G10 P[11]) a partir de los sueros de cobayos vacunados mediante la técnica de Seroneutralización.



- 2.2.4** Evaluar los títulos de anticuerpos en los sueros de cobayos obtenidos y analizar si cumplen con los criterios de protección previamente establecidos, a través de la correlación entre títulos de anticuerpos en suero de cobayos y títulos de anticuerpos en bovino, como método para verificar la potencia vacunal.



3. MATERIALES Y MÉTODOS



3.1 VIRUS Y CÉLULAS

3.1.1 Virus

En el desarrollo de esta tesis se utilizó exclusivamente virus perteneciente al género Rotavirus más específicamente Rotavirus que afectan a las especies bovinas. Se utilizó como cepa vacunal, la cepa de Rotavirus bovino (RVB) WC3, la cual fue adquirida en el banco de células de la American Type Culture Collection (ATCC, VR-2101). Esta cepa pertenece al serogrupo A posee un genotipo G6P[5]. Como cepa homóloga se utilizó la cepa INDIANA la cual posee un genotipo G6P[5] igual al de la WC3. Como cepa heteróloga se utilizó la cepa B223, que posee un genotipo G10P[11]. Ambas cepas fueron cedidas por la Dra. Viviana Parreño - sección de Virus Entéricos, Instituto de Virología del INTA - Argentina.

3.1.2 Línea Celular

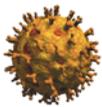
Se utilizó la línea celular MA104 provenientes de células epiteliales de riñón fetal de mono Rhesus *Cercopithecus aethiops* (ATCC CRL-2378) que son permisivas a la infección por Rotavirus. Estas células son cultivadas en medio Mínimo de Eagle (MEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) a 37°C y atmósfera de CO₂ al 5%.

3.2 MULTIPLICACIÓN DEL VIRUS

La inoculación del virus se realiza una vez que la monocapa celular está confluyente y posee entre 24 a 48 horas de incubación ya que se encuentra en la fase de crecimiento exponencial. Se utiliza una multiplicidad de infección (MOI) baja, entre 0.1 y 0.01 partículas virales por célula asegurando que durante la amplificación se preserve la integridad genética viral y evitando la acumulación de partículas defectivas interferentes las cuales deprimen el rendimiento de la progenie viral infecciosa.

Todas las suspensiones de la cepa WC3 a inocular fueron previamente incubadas con tripsina bovina, 10 ug/mL durante 30 minutos a 37°C. La tripsina induce cambios estructurales sobre la proteína VP4, mediante el corte de la secuencia de aminoácidos en la región 241-247 con producción de las proteínas VP8 y VP5, lo cual se refleja en un aumento de la infectividad del Rotavirus [20, 85,86].

Una vez pasado el periodo de adsorción viral (una hora de incubación del inóculo con las células) se retira el mismo, y se coloca medio MEM sin SFB y con una



concentración de tripsina de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, para la activación proteolítica de los nuevos de viriones producidos.

Al momento de la cosecha se congela y descongela la monocapa infectada, se recupera el medio post-infección con restos celulares y se clarifica mediante centrifugación a 2500 RPM durante 15 minutos. Posteriormente se almacena la suspensión vírica a -80°C .

Para la multiplicación viral de las cepas INDIANA y B223, se utilizó el mismo protocolo anterior con la excepción de que se utilizó la enzima proteolítica pancreatina en lugar de tripsina, a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la previa activación del virus antes de la inoculación y una concentración de pancreatina a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el medio post-infección.

3.3 TITULACIÓN VIRAL

3.3.1 Titulación por Dosis Infecciosa 50.

La cuantificación del título vírico infeccioso de suspensiones de RVB se realizó por el método de Reed y Muench [87], y fue expresado mediante dosis infecciosa tejido celular₅₀/mL (DITC₅₀) [88]. Se utilizaron monocapas celulares de la línea celular MA104 crecidas en placas de 96 pocillos. Para ello se sembraron 100 μL de una suspensión celular cuya concentración oscilaba entre 1.8×10^4 y 2×10^4 células/mL. Una vez la monocapa celular alcanzaba la completa confluencia, entre 24 y 48 horas de sembradas, se retira el medio de crecimiento y se realiza dos lavados a las monocapas celulares con un medio MEM sin SFB. Se realiza la activación de la suspensión vírica a inocular con la enzima proteolítica correspondiente como se detalló anteriormente. Posteriormente se inocula 100 μL de diluciones seriadas en base a 10, de la suspensión vírica a cuantificar en cada uno de los pocillos a razón de un mínimo de 5 réplicas por dilución ensayada. Una vez realizada la adsorción viral y la adición del medio post-infección, se incuba a 37°C al 5% de CO_2 . Después de 5 a 6 días de incubación se realiza la lectura de la placa determinando la presencia de efecto citopático celular en cada uno de los pocillos.



3.3.2 Titulación mediante Inmunofluorescencia Directa.

Se realizó la titulación empleando la técnica de detección por Inmunofluorescencia [89], que permite cuantificar por unidades formadoras de focos fluorescentes (UFF). Esta es la técnica principal de titulación viral utilizada en la sección de Virus Entéricos, Instituto de Virología del INTA – Argentina, nuestro principal laboratorio de referencia.

Este método se basa en la detección de proteínas virales en las células infectadas a través del uso de un anticuerpo policlonal anti-Rotavirus conjugado con fluoresceína. Para ello se prepararon monocapas celulares de MA104 como se describió anteriormente en 3.3.1. A las 24 horas de sembradas se infectaron con de 100 μL de diluciones seriadas en base a 10, de la suspensión vírica a cuantificar en cada uno de los pocillos a razón de 2 réplicas por dilución ensayada. Luego de la adsorción vírica y posterior retiro del inóculo y adición de medio post-infección, se incubó durante 48 horas. Pasado este tiempo, se fijan las células con acetona al 70%, durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se deja secar a temperatura ambiente entre 30 a 45 minutos. Posteriormente se coloca el anticuerpo policlonal anti-Rotavirus realizado en cabra y conjugado con isotiocianato de fluoresceína (Pierce PA1-73014), el cual es diluido a una relación 1/150 en solución de Azul de Evans. Se incuban las placas a 37°C a 5% de CO₂, durante 60 minutos, se realizan 2 lavados con PBS y se procede a leer la placa en microscopio de inmunofluorescencia. Se registra el número de UFF por dilución y se calcula el título viral, el cual es expresado como unidades formadoras de focos fluorescentes por mililitro (UFF/mL).



3.4 GENOTIFICACIÓN DE CEPAS VIRALES

3.4.1 Genotipado de la proteínas VP7 (genotipo G) y de VP4 (genotipo [P]) mediante RT-PCR *Heminested Multiplex*

En primer lugar se realizó una extracción del ARN viral con TRIZOL LS® siguiendo las instrucciones del fabricante, a partir del sobrenadante de cultivos. Se inicia con 200 µL del sobrenadante clarificado.

Para la primera amplificación se realizó una RT-PCR en una sola reacción. Para la retrotranscripción se empleó la enzima Superscript II (Invitrogen) y la Taq Pol (Invitrogen) para la PCR, siguiendo el protocolo propuesto por el proveedor. Se emplearon por un lado para VP7 los oligonucleótidos Beg9 y End9 que permiten amplificar el gen completo de VP7 (1062pb) [90] y por otro lado para VP4 los oligonucleótidos Con3dg y Con2d que amplifican un segmento del gen de esta proteína. (876pb) [91].

Brevemente, primero se preincuba el molde de ARN (8µL) con una mezcla equimolar de ambos oligonucleótidos (2µM) a 95°C durante 5 minutos y luego hielo por 5 minutos. Posteriormente se prepara junto con el respectivo Buffer Tris-HCL (20mM, pH 8.4), KCL (50mM) y MgCl₂ (1.5mM), según lo indica el fabricante. Se alcanza un volumen final de 50µL, agregando la mezcla de dNTPs (0.2mM), los oligonucleótidos (0.1µM), DTT (50mM) y agua. El ciclado se llevó a cabo en Termociclador (Thermo) del siguiente modo: RT; (42°C) por 60min, desactivación (72°C) 15 min; PCR; 30 ciclos de: desnaturalización (94°C) 1 minuto, hibridación (42 °C) 2 minuto y polimerización (72°C) 1 minutos. Por ultimo 72 °C por 7 minutos.

Posteriormente en una reacción de PCR - Heminested Multiplex, se amplificó un fragmento concreto del gen mediante oligonucleótidos específicos de genotipo de la región hipervariable del gen [90, 92]. Así, se utilizó un cebador común a todos ellos y uno específico para cada uno de los genotipos de interés que generaron un tamaño exclusivo de cada genotipo (ver Tabla 2, Figuras 3 y 4). Para ello se utilizó la enzima Taq Pol (Invitrogen), junto con: MgCl₂ (1.5mM), Buffer Tris-HCL (20mM, pH 8.4), KCL (50mM), dNTPs (0.2mM) y el grupo de oligonucleótidos respectivo (0.2µM) cada uno y se llevó a un volumen final de 50µL. Ciclado: (94°C) 2 min; 30 ciclos de: desnaturalización (94°C) 30 segundo, hibridación (42 °C) 30 segundo y polimerización (72°C) 45 segundo. Por ultimo 72 °C por 7 minutos.

Con el fin de observar los productos obtenidos en la segunda PCR, se realizaron corridas electroforéticas en geles de agarosa al 2 % en buffer TAE 1X. Se



sembraron en cada pocillo 10 μL de los productos de PCR con 2 μL de buffer de carga 6X *EZ Vision® DNA Dye* el cual permite la visualización de los fragmentos amplificados de ADN mediante los UV. La corrida fue realizada por 30 minutos a 100 voltios. Se visualizaron las bandas mediante luz ultravioleta.

TABLA 2. Oligonucleótidos Utilizados para la Amplificación y Tipificación de VP7 y VP4 [92, 93].

Nombre y polaridad	Secuencia	Posición nucleotídica	Fragmento Esperado
Beg (+)	5'GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG 3'	1 al 28	1062pb
End (-)	5'GGTCACATCATAACAATTCTAATCTAAG 3'	1036 al 1062	
Con 3(+)	5'TGGCTTCGCTCATTATAGACA 3'	11 al 32	876pb
Con 2 (-)	5'ATTCGGACCATTTATAACC 3'	887 al 868	
G6(-) DT6	5'CTAGTTCCTGTGTAGAATC 3'	499 al 481	500pb
G6 (-) N167	5'TATAAGCAGAAAAGCTGTAA 3'	167 al 149	167pb
G6 (-) H167	5'AACGAATAAAAAATCTGTAA 3'	167 al 149	167pb
G8(-) HT8	5'CGGTTCCGGATTAGACAC 3'	273 al 256	274pb
G10(-) HT10	5'TTCAGCCGTTGCGACTTC 3'	714 al 697	715pb
P[1](-) P1K	5'ACCAACGAACGCGGGGGTG3'	282 al 264	622pb
P[5](-) P5K	5'RCCAGGTGTCRCATCAGAG 3'	354 al 336	555pb
P[11](-) PB223	5'AACGAATAAAAAATCTGTAA 3'	594 al 574	314 pb

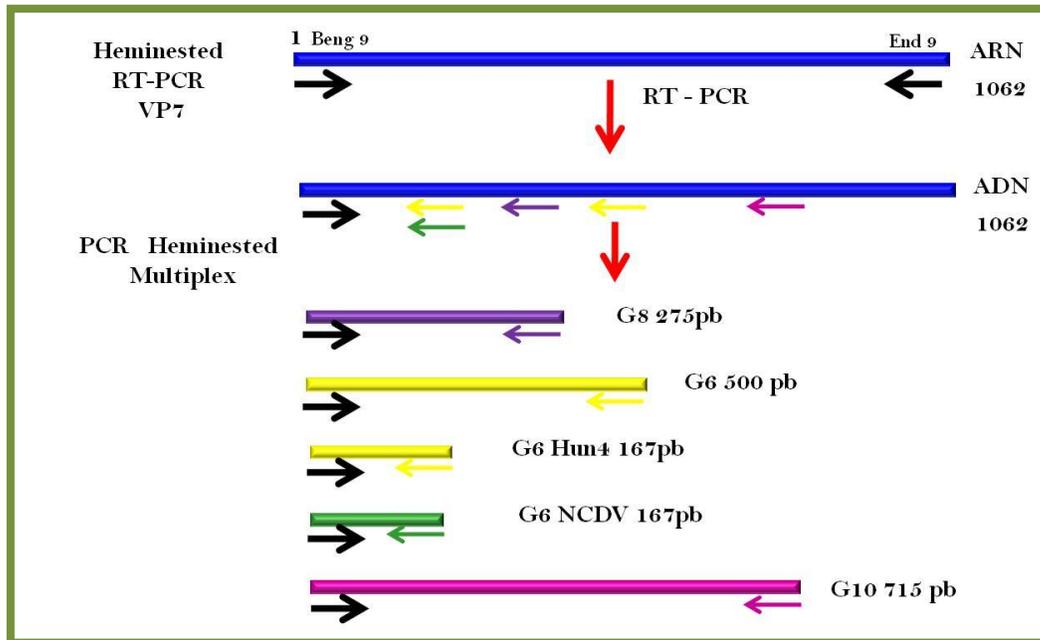
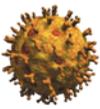


FIGURA 3. Esquema del gen codificante de la glicoproteína VP7 y el lugar de unión de los diferentes oligonucleótidos que se utilizaron para el genotipado. También se muestran los tamaños resultantes esperables del gen entero y para cada uno de los genotipos después de la amplificación mediante PCR Heminested Multiplex. Adaptado de Gouvea, 1990 [90].

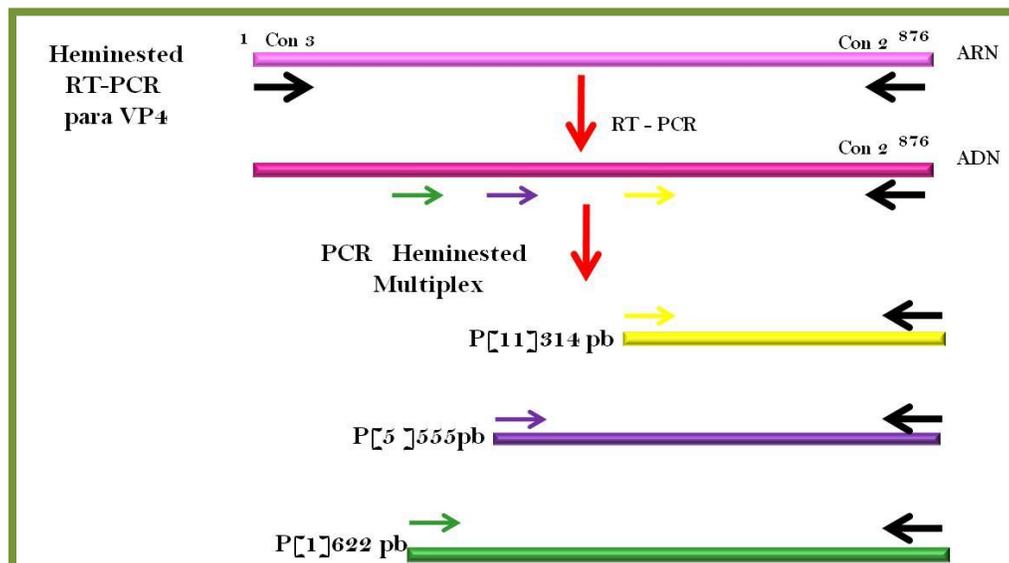


FIGURA 4. Esquema del gen codificante de la glicoproteína VP4 y el lugar de unión de los diferentes cebadores que se utilizaron para el genotipado. También se muestran los tamaños resultantes esperables del gen entero y para cada uno de los genotipos después de la amplificación mediante PCR Heminested Multiplex. Adaptado de Gouvea, 1994 [93].



3.5 PRODUCCIÓN INOCULO VIRAL VACUNAL

La producción uniforme de vacunas de gran calidad, inocuas, potentes y eficaces requiere procedimientos de garantía de calidad para asegurar la uniformidad y consistencia del proceso de producción. Puesto que los procesos de producción de vacunas proporcionan una gran oportunidad para la variabilidad, se debe tener cuidado en controlar ésta en la medida de lo posible, utilizando, preferiblemente, procedimientos validados, y proteger el producto de la contaminación a lo largo de todas las etapas de producción [94].

Entre los requisitos que se deben seguir en la elaboración de vacunas veterinarias, es relevante la obtención de antígenos en cantidad suficiente para una producción industrial, para ello se deben emplear sustratos celulares que tengan probada la ausencia de contaminantes adventicios. Se recomienda el uso de los cultivos celulares de línea que permitan contar con stocks de células controladas y que se utilicen en la producción uniforme de los lotes de vacuna. El sistema de bancos de células y semillas garantiza una fuente constante de material de partida caracterizado y controlado en su pureza e identidad. Debe probarse la ausencia de contaminantes, tanto en las células stock, así como las células de trabajo, en los virus stock, en los antígenos producidos [94]. Los siguientes pasos de producción detallan esos requerimientos.

3.5.1 Producción del sistema de banco de células:

Una vez adquirida la línea celular continua MA104, (ATTC numero CRL-2378.1) se procedió a generar el sistema de banco de células, el cual está integrado por el banco de células maestras (master cell bank, MCB) y el banco de células de trabajo (working cell bank, WCB).

Para generar el MCB se tripsinizó el 2do pasaje de las replicación iniciales de las células MA104 una vez recibida. El sobrenadante se centrifugó a 1500 RPM durante 5 minutos y el sedimento celular se resuspendió en medio de congelación celular (suero fetal bovino al 10% de Dimetilsulfóxido, DMSO) a una concentración de 5×10^6 células/mL en diferentes crioviales. Los crioviales se almacenaron a -80°C , para garantizar su estabilidad durante su almacenaje. De esta manera generamos una colección de células MA104 de composición uniforme derivada de una fuente única, preparadas bajo condiciones de cultivo iguales.

Posteriormente se procedió a la obtención del WCB para el cual se realizaron a partir de un criovial del MCB dos pasajes en consecutivos para producir crioviales en cantidades suficientes, ya que el WCB está destinado a ser utilizado en la



producción de cultivos celulares para la generación de los antígenos vacunales. Si las células de más de un criovial de WCB eran utilizadas, las suspensiones celulares se mezclaban en el momento de la descongelación. Figura 5.

3.5.2 Producción del sistema de semilla viral:

Este sistema al igual que el sistema de banco de células, está compuesto por una semilla viral maestra (*master viral seed*, MVS) y una semilla viral de trabajo (*working viral seed*, WVS). El MVS fue generado a partir del 6^{to} pasaje de la cepa de RVB WC3, adquirida a través de ATCC (numero VR-2101). Durante su elaboración se mantuvo las características principales de un MVS, en cuanto a la generación de diferentes crioviales, procesado todo de la misma manera, en una sola operación, asegurando la uniformidad y evitando riesgo de contaminación [95]. Figura 5. Los crioviales se almacenaron a -80°C , para garantizar la estabilidad durante su almacenaje. Se obtuvieron a partir de la inoculación de frascos de cultivo de 80 cm^2 con 24 horas de sembrados con una monocapa celular proveniente de WCB.

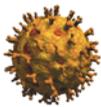
El WVS se generó a partir de pasajes continuos del MVS (séptimo pasaje), en botellas tipo Roux. Figura 5. Se manejó y almacenó en las mismas condiciones que para el MVS. La MOI utilizada fue de 0.01 y la suspensión viral fue cosechada entre el tercer y cuarto día post-infección.

3.5.3 Producción del Antígeno viral.

A partir del WVS se inocularon 14 frascos Roller con una superficie de 960 cm^2 , y se colocaron en incubadora roller a 0.1 RPM, a 37°C . A partir de estos se pudo obtener entre 2,8 a 3 litros de antígeno. Se utilizó una MOI de 0.05. Se cosecharon a las 72 horas post-infección, con el 90% de la monocapa celular desprendida. No se usó ni Penicilina ni otros Beta-lactámicos en ninguna de las etapas de la producción.

3.5.4 Inactivación del Antígeno Viral

Para este proceso se utilizó un inactivante de primer orden, el cual fue el BEI. Este se genera *in situ* añadiendo bromhidrato de 2- bromo etilamina (BEA). El BEA es un sólido relativamente inerte pero bajo condiciones ligeramente alcalinas este se cicla para formar BEI. De acuerdo con esto, en el momento de añadir BEA es necesario ajustar el pH del cultivo a un valor ligeramente alcalino en el intervalo de 7,0 a aproximadamente 8,0 [95].



Se preparó una solución de bromhidrato de 2- bromo etilamina (BEA) al 0.1 M aproximadamente y 0.2 N de hidróxido de sodio, se colocó a 37^ac durante una hora hasta formar BEI por ciclización. Para controlar que el pH se mantenga ligeramente alcalino se coloca un indicador químico de pH. Una vez formado el BEI, se coloca la suspensión viral a una concentración final de BEI 0.001M. El proceso de inactivación continuó durante 24 horas a 37°C, bajo agitación continua. Después de inactivar la suspensión vírica, se toma una muestra para realizar control de inactivación y comprobar su inocuidad. Posteriormente se agregó una solución de tiosulfato de sodio 1M a razón de 1% v/v de la suspensión vírica para neutralizar los residuos de BEI. Figura 5.

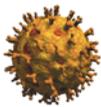
3.5.5 Controles de Esterilidad

Se realizó control de esterilidad, a todos los bancos generados, ya sean bancos de células o de semillas virales garantizando que los mismos estuvieran libres de agentes contaminantes como bacterias, hongos y otro agente adventicios [96]. También se realizó control de esterilidad a todos los reactivos utilizados para la generación de tales bancos (tripsina, suero fetal bovino, medios de cultivo), así como también a los antígenos inactivados y a la vacuna formulada. Figura 5.

Para ello se realizaron los siguientes procedimientos:

- Inoculación del sustrato a controlar a una proporción de 1:20, en medio de Caldo de Tioglicolato y medio de cultivo Sabouraud, los cuales tienen la capacidad de detectar presencia de bacterias tanto aeróbicas como anaeróbicas y detección de levaduras y hongos respectivamente. Ambos medios se incuban a 37°C y temperatura ambiente simultáneamente durante 15 días con revisión diaria para la observación de cambios como turbidez, cambio de color. No debe ocurrir crecimiento de microorganismo, en ninguno de los cultivos.
- Para el descarte de *Mycobacterium tuberculosis*, se realizó análisis por PCR a partir de muestra de raspado de monocapa celular del MCB y de la suspensión de células infectada con 6to pasaje de la cepa WC3 el cual fue quien le dio origen al MVS (Pre-semilla maestra viral, PMVS) Se realizó la técnica descrita por Kuppeveld y colaboradores, 1994 [97].

3.5.6 Controles Fenotípico y Genotípicos de la Cepa Viral Vacunal



Se realizó una evaluación fenotípica del sistema de semillas virales, observando características como crecimiento en el sustrato de células de producción y la viabilidad de las suspensiones virales obtenidas durante el almacenamiento [96], tanto para MVS como para WVS. Además, se observó la estabilidad del fenotipo viral en pasajes subsiguientes, más allá del nivel de pasaje utilizado en esta producción. Los pasajes empleados para calificar la semilla del virus es generalmente de 5 a 10 pasajes más del utilizado para la producción de antígenos [98]. Figura 5.

Una evaluación genotípica se realizó con la genotificación de cepa vacunal WC3, como se detalla en el punto 3.4 y fue realizado a partir de PMVS.

También se realizó la respectiva valoración de los títulos virales como se detalla en el punto 3.3.1 tanto para MVS como para WVS.

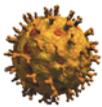
3.5.7 Control de inocuidad del antígeno inactivado

A fin de asegurar de manera absoluta la ausencia de virus infectante en el antígeno inactivado, se realiza la inoculación de monocapas de la línea celular MA104 siguiendo el protocolo que se detalla en el punto 3.2. Se realizó 3 pasajes ciego de la cosecha de la suspensión celular inicial obtenida, para la verificación de la no existencia de multiplicación viral alguna. Se realizó 3 pasajes ciego para descartar la posibilidad que en pasaje inicial pudiese haber multiplicación viral y no observar efecto citopático por poca carga viral .

3.6 ADYUVANTES UTILIZADOS PARA LA FORMULACIÓN DEL ANTIGENO VACUNAL

Entre los factores que influyen en la selección de un adyuvante esta la especie animal, el patógeno específico, el tipo de antígeno de la vacuna, la vía de la vacunación y el tipo de inmunidad que se necesita desarrollar. Para este estudio se decidió utilizar los principales adyuvantes acuosos y oleosos, con las que son producidas las vacunas para el ganado bovino.

Se realizó la formulación del antígeno vacunal (antígeno viral inactivado) con 2 adyuvantes, uno acuoso (hidróxido de aluminio) y un adyuvante tipo oleoso conocido como Adjuvac⁵⁰ propio de los laboratorios Santa Elena S.A. El ADYUVAC⁵⁰, de base oleosa mineral, es un inmuno-adyuvante diseñado para la formulación de vacunas oleosas tanto para emulsiones primarias como de doble



emulsiones. La composición está basada en ésteres de sorbitán coadyuvados con cantidades menores de agentes emulsificantes [99].

Se estableció que para la formulación de la vacuna la suspensión viral a inactivar debía tener un título viral de RVB de WC3 de mínimo 10^7 /mL DITC₅₀, y que cada dosis vacunal (de 3 mL c/u, compuestas de antígeno, adyuvantes y otros componentes) suministrara el mismo título viral inactivado. Ese límite de dosificación se estableció siguiendo la recomendación suministrada por la sección de Virus Entéricos, Instituto de Virología del INTA - Argentina, Dra. Viviana Parreño, donde la clasificación de vacunas con resultados de potencia muy satisfactorios, son aquellas que formuladas en base a suspensiones virales con títulos iguales o mayores a 10^7 UFF/mL. También nos basamos por resultados obtenidos en estudios anteriores [43, 81, 58, 100].

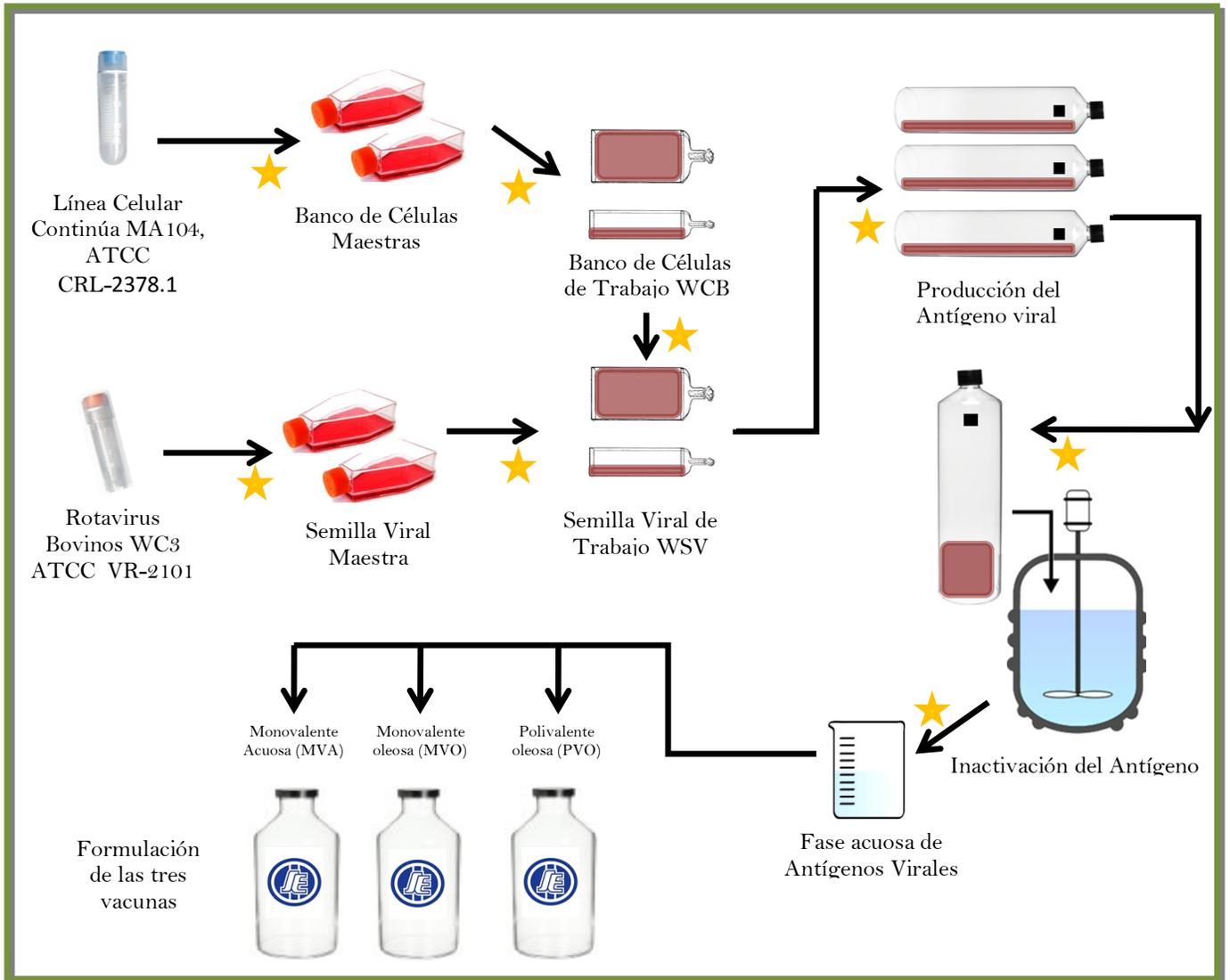


Figura 5. Proceso de producción de la vacuna contra RVB. En el diagrama de flujo se muestran cada uno de los pasos realizados durante la producción de las tres formulaciones de vacuna inactivada contra RVB. Las estrellas al lado de cada flecha de producción, indican cada una de las etapas donde se realiza uno o varios controles de calidad (control de esterilidad, titulación viral, control de inocuidad, control fenotípico o genotípico).



3.7 ENSAYO DE INMUNIZACIÓN

Se trabajó con las especies animales cobayos y bovinos. Es por ello que todo el manejo y disposición de estos, se realizó conforme a las normas de ética e implicancia del Bienestar Animal y siguiendo lo dictaminado en la “Ordenanza Sobre Uso de Animales en Experimentación, Docencia e Investigación Universitaria” de la Universidad de la República y de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA), contando con las respectivas acreditaciones pertinentes para la realización de estas actividades.

3.7.1 Protocolo de Inmunización en Cobayos

Se utilizaron 3 grupos de 10 cobayos albinos (*Cavia Porcellus*) c/u, con un peso aproximado a 500 gramos para cada una de las tres formulaciones. Para el grupo control se emplean 5 cobayos.

La vacunación de los cobayos se realizó en la zona inguinal por vía subcutánea, utilizando 1/5 de una dosis de la vacuna formulada en el paso 3.6, en este caso se inocula un volumen de 0.6 mL. Se administra una dosis inicial (día 0), y una segunda inmunización a los 21 días.

Para la obtención de muestra de suero de cobayo se realizó el sangrado al día 30 y 60 post primo vacunación. Así mismo, al día 0 se sangraron 2 cobayos por cada grupo formado para obtener las muestras de suero pre inmune. La sangre se obtiene por punción cardíaca, utilizando jeringas de 10 mililitros estériles y aguja 21G. La sangre se deja en reposo hasta la coagulación y luego se centrifuga a 1500 RPM por 10 minutos. Los sueros obtenidos se congelan a -20°C hasta su utilización.

Este ensayo fue realizado en las instalaciones del Laboratorio Santa Elena destinadas para este fin.

3.7.2 Protocolo de Inmunización en Bovinos

Se utilizaron cinco hembras bovinas raza Holando y cruza Holando –Jersey, las cuales se encontraban en el último tercio de la gestación. Se generaron dos grupos, un grupo conformado con tres animales que fueron vacunados y el grupo control con dos animales.

En el grupo de hembras vacunadas se realizó la inmunización con la formulación vacunal a los 20 días antes del parto (día 0), con una dosis de 3 mL colocada a



nivel subcutáneo, en el área del cuello delante o sobre la escápula. No hubo revacunación.

Se realizaron tomas de muestras de diferente procedencia tanto en las hembras preñadas así como en los terneros recién nacidos; como se detalla a continuación.

En las hembras preñadas: al día 0 se sangran todas las vacas del ensayo (vacunadas y controles), para obtener la muestra de suero control pre-inmune. Posteriormente se sangran 24 a 48 horas después del parto que es el día 21 o 22 post-vacunación (PV) y 21 días después del parto (día 43 PV). Se obtienen entre 8 mL de sangre a través de una punción de la vena o arteria coccígea utilizando jeringas de 10 mililitros estériles y aguja 18 G. Se toman muestras de 20 mL de calostro entre las 24 y 48 horas posteriores al parto (PP) y 20 mL de leche a los 7, 15 y 21 días PP.

En los terneros: se realiza una toma de 8 mL de sangre a las 48 horas, 7, 15 y 21 días de nacido a través de una punción de la vena yugular utilizando jeringas de 10 mililitros estériles y aguja 21G. También se realizan tomas de heces a las 48 horas, 7, 15 y 21 días de nacido.

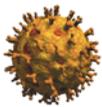
El ensayo fue realizado con colaboración de la Facultad de Veterinaria en el tambo del Campo Experimental N° 2 de esta facultad, (Ruta 1 Km 42, San José).

3.8 DETECCIÓN DE ANTIGENO VIRAL

3.8.1 Técnica de ELISA KERI

Esta técnica es un ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) doble sándwich. Fue desarrollado por la sección de Virus Entéricos, Instituto de Virología del INTA – Argentina a partir de la técnica descrita por Cornaglia y col, 1989 [101], con algunas modificaciones [102]. Es uno de los principales métodos para detección de antígeno rotavirales en muestras de heces o de sueros de animales infectados o enfermos con el síndrome diarrea neonatal en terneros, que realiza esta sección. Este método detecta principalmente la proteína Vp6 de la segunda recubierta del virión, la cual es altamente estable e inmunogénica y permite la detección de Rotavirus del tipo A [102].

Este ensayo se aplicó para la detección de Rotavirus en muestras de suspensiones virales obtenidas a partir de cultivos celulares; en las formulaciones vacunales y en

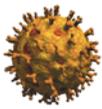


muestras provenientes de materia fecal de terneros que participaron en el ensayo de inmunización. En la medida de lo posible se replicó este método en las mismas condiciones que en origen. Para ello se contó con reactivos y sueros patrones donados por la sección de Virus Entéricos del Instituto de Virología del INTA.

El procedimiento consta de una etapa de sensibilización de la placa con un anticuerpo de captura obtenido a partir de un suero de cobayo hiperinmunizado con RVB (Cepa NCDV Lincoln). Se realizaron columnas tanto de captura positiva (policlonal anti RVB) (números impares) y columnas de captura negativa (Ac derivado de suero normal de cobayo) (números pares). Se incubó la placa durante 90 minutos a 37° C, se descartó el contenido de la placa y se lavó la placa 2 veces con PBS/Tween. Posteriormente se colocó cada una de las muestras problemas por duplicado para cada columna. Se incubó la placa de 90 minutos a 37° C y se lavó nuevamente cuatro veces con PBS/Tween. Se colocó el anticuerpo secundario conjugado (Igs purificadas obtenidas a partir de un suero policlonal de bovino hiperinmunizado con la cepa de RVB antes mencionada). Se realizó la incubación y lavado anteriormente descrito y se colocó un anticuerpo comercial anti IgG bovina realizado en cabra y marcado con peroxidasa (KPL, 14-12-06). Se incubó y lavó la placa nuevamente. Por último se reveló agregando el sustrato cromógeno el H₂O₂-ABTS al 0.05%. Se dejó reaccionar 10 minutos o hasta obtener una señal francamente positiva en el control positivo. Se detuvo la reacción con 50 µL de dodecilsulfato (SDS) al 5%. La lectura se realizó a 405 nm en el Lector de ELISA, Multiskan FC marca Thermo. Los ensayos se realizaron con un control positivo (muestra positiva con un título conocido probado al menos en 5 ensayos), un control negativo (muestra negativa) y blanco de reactivos (PBS/Tween). Para las lecturas e interpretación se debe calcular la Densidad óptica corregida (DOc) (DO captura positiva – DO de captura negativa) de cada muestra, el promedio y el desvío del Blanco de Reactivos, (media de la DOc de los pocillos captura positiva con PBS) y el punto de corte de la placa (promedio del Blanco + 3 Desvío Estándar). También se puede considerar como guía adicional que el punto de corte de la prueba suele tener un valor 0,200 siguiendo la referencia del instructivo IVD 009, Elisa KERI Detección de Rotavirus Grupo A [102].

Una muestra se considera positiva si su DO en la captura positiva es mayor al punto de corte de la placa y su DO corregida es mayor a 0,200.

El título del antígeno viral de la muestra se expresa como la inversa de la máxima dilución cuya DO en captura positiva sea mayor al punto de corte de la placa y su DO corregidas mayor a 0,200 unidades de absorbancia.



Las Elisa tipo doble sándwich son ensayos con una gran especificidad y sensibilidad. Entre los que podemos mencionar que sin la primera capa de la "captura" de anticuerpos, las proteínas que se encuentre junto a nuestro antígeno de interés, pueden competir por la adsorción en la superficie de la placa, reduciendo la cantidad de antígeno inmovilizado. Este método doble sándwich, puede ser particularmente favorable para aquellos virus en heces (como en caso de RVB) o en secreciones, donde la proporción de proteínas antigénicas específicas virales son relativamente bajas, en comparación con el resto del contenido proteico de la muestra. El uso de los anticuerpos purificados específicos para unir el antígeno en el plástico elimina la necesidad de purificar el antígeno a partir de mezclas complejas antes de la medición, lo que simplifica el análisis, y el aumenta el nivel de la especificidad y la sensibilidad del ensayo. Otro factor que puede influir en la pobre unión de antígenos rotavirales a la placa, es en casos de tratarse de partículas virales intactas, por poseer las mismas formas esféricas, son más difíciles de ser adsorbidas y más fáciles de ser eliminadas de la superficie plástica con la mecánica de los lavados. Esta prueba ofrece una ventaja sobre las pruebas indirecta en la cuantificación de antígenos, ya que la adsorción directa de las proteínas a la placa a menudo no es lineal, es decir, no es proporcional a la cantidad de proteína en la muestra. Lo principal para poder elaborar esta técnica es que el antígeno presente dos o más sitios de unión antigénicos.

3.8.2 Técnica de ELISA KERI modificado

A partir del ELISA KERI, detallado anteriormente, se desarrolló este nuevo protocolo para la detección de antígeno de Rotavirus, con algunas modificaciones a fin de adaptarlo a las condiciones particulares del laboratorio Santa Elena.

Para la sensibilización de la placa se utilizó un anticuerpo policlonal contra RV grupo A (cepas humanas Wa, DS-1, entre otras) hecho en oveja de origen comercial (Pierce, PA1-85845). Esto conllevó a cambios en el reactivo utilizado en la captura negativa donde se empleó buffer de sensibilización en lugar de anticuerpos derivados de suero normal de oveja. Se eligió emplear buffer ya que este anticuerpo policlonal posee un alto grado de pureza y bajo nivel de señal de fondo, además de garantizar la no producción de reacciones inespecíficas, a diferencia de un anticuerpo derivado de un suero normal. Para la detección del antígeno se adquirió un anticuerpo comercial conjugado con peroxidasa, es un anticuerpo policlonal contra Rotavirus grupo A (cepa NCDV) hecho en cabra (Pierce, PA1-73015). Con



la aplicación de este reactivo redujo un paso de la técnica anterior, la colocación del anticuerpo anti-Rotavirus y del anticuerpo conjugado se realiza al mismo momento.

Cabe resaltar que el ELISA KERI fue utilizado como punto de control para el desarrollo y estandarización de los cambios en esta técnica.

3.9 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI – ROTAVIRALES

3.9.1 Técnicas de Seroneutralización

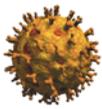
3.9.1.1 Seroneutralización por Dosis Efectiva 50.

Esta técnica es realizada para medir los títulos de anticuerpos neutralizantes presente en las muestras de sueros de cobayos y sueros de bovinos proveniente de las pruebas de inmunogenicidad vacunal. Para estandarizar y controlar el método se emplearon sueros patrones otorgados por la Dra. Viviana Parreño - sección de Virus Entéricos, Instituto de Virología del INTA - Argentina.

Se utilizó la microtécnica de Seroneutralización en cultivos celulares descrita en el Manual de diagnóstico de Enfermedades Virales, Rickettsias, Clamidia [119], así como el utilizado por MURAKAMI, y colaboradores 1983[120] y Sato, y colaboradores 1981 [121], con algunas modificaciones. Se utilizó el método BETA, donde se varían las diluciones del suero, dejando constante la cantidad de virus.

Para la prueba de seroneutralización se debe utilizar una dilución de virus que contenga 100 TCID₅₀, con un límite de +/- 50 TCID₅₀. Se realizan diluciones en base a 4 de los sueros previamente inactivados. Se enfrentan 100 µL de cada una de las diluciones del sueros a las 100 TCID₅₀ virales en una placa auxiliar y se coloca a 37°C durante 90 minutos para que ocurra el proceso de seroneutralización viral. Se procede a lavar la monocapa celular de MA104 que fueron crecidas en placas de 96 pocillos como se describe en 3.3.1. Se inoculó cada pocillo con 100 µL de la mezcla virus y suero, a 5 réplicas por dilución y se deja incubar durante 1 hora a 37°C. Se retiró el inoculo y se colocó 100 µL de medio MEM post-infección conteniendo una concentración de enzima proteolítica como se detalla en 3.2.

Después de 5 días de incubación se realiza la lectura de la placa determinando la presencia de efecto citopático celular en cada uno de los pocillos para posteriormente calcular la dosis efectiva₅₀ por Reed y Muench [87]. Se debe



colocar control de células, control de citotoxicidad de los sueros, control de TCID₅₀ y una titulación viral simultánea, para poder validar la prueba.

3.9.1.2 Seroneutralización por Reducción de Foco Fluorescente

Este otro método de medición de títulos de anticuerpos neutralizantes fue utilizado como estrategia para determinar diferencias entre los resultados obtenidos por seroneutralización por Dosis Efectiva 50 (DE₅₀). Esto se realizó motivado a que este método es el empleado por la sección de Virus Entéricos, Instituto de Virología del INTA – Argentina, el cual es nuestro principal referente. Se utilizó la técnica descrita por Gernar y colaboradores, 1984 [103], con algunas modificaciones.

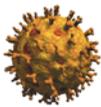
Al igual que en seroneutralización por DE₅₀, se realizaron diluciones en base a 4 de los sueros previamente inactivados. El proceso de incubación del virus y las diluciones de los sueros y la inoculación de la monocapa celular de MA104 es igual que en el método anterior (ver 3.9.1.1). Esta prueba se utiliza una dilución de virus que contenga entre 200 UFF, con un límite de +/- 50 UFF. Se realiza 2 réplicas por dilución ensayada.

Luego de 48 horas de incubación se fijan las células y posteriormente se coloca el anticuerpo policlonal anti-RVB conjugado con isotiocianato de fluoresceína (PA1-73014) diluido a una relación a 1/150 en Azul de Evans de la forma en que se detalla en el ítem 3.3.2. El título de neutralización de los sueros deberá leerse siempre y cuando los controles y la titulación viral final se encuentren dentro de lo esperado. El título de seroneutralización se expresa como el logaritmo en base 10 del inverso de la máxima dilución que logra reducir más del 80% del número de UFF.

3.9.2 Técnicas de ELISA.

3.9.2.1 Técnica de ELISA para detección de anticuerpo anti rotavirus IgG totales. INTA

Esta técnica es utilizada por la sección de Virus Entéricos, Instituto de Virología del INTA – Argentina, para la detección de anticuerpos del isotipo IgG en muestras de origen bovino (suero, calostro, leche, materia fecal) y en sueros de



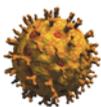
cobayos. Es un ELISA doble sándwich, descrita por Fernández y col. 1998, con ciertas modificaciones [104, 105, 58].

Durante la realización de este proyecto de tesis, este método fue utilizado principalmente como punto de control para el desarrollo y adaptación de algunas modificaciones sobre esta técnica de ELISA para el ajuste de la misma a las condiciones particulares de nuestro laboratorio. Los reactivos y sueros patrones necesarios para poder replicar este método en iguales condiciones que las originales, fueron donados por la sección de Virus Entéricos, Instituto de Virología del INTA – Argentina [106].

El protocolo [106], consiste en una primera etapa de sensibilización de la placa con un suero hiperinmune anti-RVB obtenido en cerdo gnotobiótico (cedido por: Dra L. J. Saif- FAHRP-OSU, USA) en buffer carbonato-bicarbonato pH: 9,6. Las placas se incuban durante 18 horas a 4-8° C y luego se bloquean con leche descremada. Posteriormente se agrega sobrenadante clarificado de cultivos de células MA-104 infectados con RVB cepa INDIANA que posea un título viral no menor a 10⁷ UFF/mL (pocillos positivos, columnas impares) o sobrenadante de células MA-104 sin infectar (pocillos negativos, columnas pares). A continuación se colocan las muestras a analizar previamente diluidas en base 4 en una placa auxiliar. Finalmente, se agregan anticuerpos policlonales comerciales anti-IgG, marcados con peroxidasa. La reacción se revela utilizando H₂O₂ /0,05% ABTS como sistema sustrato / cromógeno y detenida con el agregado de 50 µL de SDS al 10%. La lectura de las placas se realiza a 405 mn. Toda placa debe llevar un control positivo (muestra positiva con un título conocido probado al menos en 5 ensayos), un control negativo (muestra negativa diluida ¼) y Blanco de reactivos (PBS/Tween).

Se calculó la densidad óptica corregida (ODc) de cada muestra (DO captura positiva – DO de captura negativa), el promedio y el desvío estándar (DE) de la densidad óptica corregida (ODc) de los controles negativos y el punto de corte de la placa (promedio de los controles negativos + 2 DE). Se toma como positivas a las muestras que cuya ODc superan el valor de corte del ensayo establecido en una $DOc = 0.100 \pm 0.050$.

El título de Anticuerpos de una muestra se establece como la inversa de la máxima dilución cuya DOc sea mayor al punto de corte de la placa, (0.100). Se informa el título de Anticuerpos anti-RVB como el log en base 10 del inverso de la máxima dilución cuyo DOc resulte mayor al punto de corte del ensayo.



3.9.2.2 Técnica de ELISA para detección de anticuerpo anti rotavirus IgG totales. Tesis

Esta técnica se utilizó para detectar anticuerpos del isotipo IgG en muestras de origen bovino (suero, calostro, leche, materia fecal) y en sueros de cobayos. Como se mencionó anteriormente, este protocolo está basado en la técnica realizada por la sección de Virus Entéricos, Instituto de Virología del INTA – Argentina, con algunas modificaciones (item 3.9.2.1). Dichas modificaciones se basaron principalmente en el uso de diferentes anticuerpos policlonales, así como también cambios en la cepa de RVB con la cual se trabajó. No se realizó ningún cambio en cada uno de los pasos a seguir.

Se empleó para la sensibilización de la placa un anticuerpo policlonal Anti-Rotavirus hecho en oveja marca de origen comercial (Pierce PA1-85845). Se utilizó una suspensión de RVB cepa WC3 producido en células MA104 con un título viral mayor o igual 10^7 /mL DITC₅₀ como antígeno viral. En cuanto a los anticuerpos conjugados con peroxidasa se adquirieron los siguientes reactivos: Anti IgG de Cobayo hecho en conejo (Invitrogen 61-4620) y Anti IgG Bovina hecho en cabra (KPL 14-12-06).

3.9.3 Técnica de Western Blot

Para la obtención del antígeno viral se realizó el procedimiento descrito por la sección de Virus Entéricos, Instituto de Virología del INTA – Argentina, con algunas modificaciones [107]. A partir de un sobrenadante clarificado (2500 RPM, durante 15 minutos) de células MA104, infectadas con RVB cepa WC3, con un título superior a 10^7 DICT₅₀/mL, se realizó una concentración en colchón de sacarosa al 40% a 35.000 RPM durante 2 horas (rotor Beckman 60Ti). El sedimento obtenido se resuspendió en 2 mL de buffer TBS – CaCl₂ pH: 7.5 que contenía 50 nM Tris, 100mM NaCl y 2 mM CaCl₂. El antígeno viral fue almacenado a -20° C hasta su posterior utilización. Un lisado de células MA104 no infectadas fue procesado de igual manera, para generar el antígeno Mock control. Se realizó la cuantificación de las proteínas por el método Bradford [108], utilizando como estándar una curva Albumina bovina sérica (BSA) de concentración conocida.



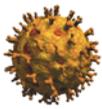
El desarrollo de la técnica se llevó a cabo según el protocolo utilizado por la Dra Andrea Villariño del laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias (UdelaR).

Para ello se colocó cada una de las suspensiones de antígeno viral en una relación de 1:2 en buffer de muestra (0,5 M de Tris-HCl (pH 6,8); 25 % v/v de glicerol; 0,5 % p/v de azul de bromofenol; 10 % v/v de SDS; 5% v/v de mercaptoethanol) y se incubaron a 95° C durante 5 minutos. Posteriormente se realizó la electroforesis en condiciones disociantes (SDS-PAGE) mediante el procedimiento general de Laemmli [109], en un equipo Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories) al 15% de poliacrilamida para el gel separador. Se cargó 3 µg de proteína cuantificada por pocillo. La migración se realizó durante 45 minutos a 200 voltios. Para la estimación del tamaño molecular se cargó un pocillo con un marcador de peso molecular (Fermentas SM0441). En paralelo se realizó un segundo gel que fue teñido con una solución de Azul de Coomassie (0,1 % p/v en una mezcla 4,5:4,5:1 de metanol: agua: ácido acético glacial) y luego se destiñó con una mezcla 30% v/v metanol, 7% v/v ácido acético glacial.

El gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa de 45 µm en buffer de transferencia (25 mM Tris; 192nM glicina; 20% v/v de etanol pH 8,3) en un equipo Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories) durante 45 minutos a 100 voltios. Una vez finalizada la transferencia, se dejó bloqueando la membrana en BSA al 1%, en buffer de transferencia a durante toda la noche a 4°C. A continuación se incubó la membrana con una dilución 1/5000 de los sueros de cobayo durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados con TBS – T (25mM Tris, 192 mM glicina, 20% etanol, 0.05% Tween 20, pH 7.5), de 5 minutos con agitación vigorosa. Posteriormente las membranas se incubaron con una dilución de 1/4000 del anticuerpo anti IgG de cobayos conjugado con peroxidasa (Invitrogen 61-4620) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizaron de 5 lavados con TBS –T de 5 minutos con agitación vigorosa. La detección se realizó utilizando el reactivo quimioluminiscente para peroxidasa de la marca SIGMA.

Para determinar las diluciones óptimas de los sueros analizados así como del anticuerpo secundario se realizó previamente un ensayo de Dot Blot siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente.

3.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS



Los datos fueron analizados empleando un análisis de test de suma de rangos de Wilcoxon para muestras no pareadas e independientes. Todos los criterios relacionados con significancia fueron basados en una probabilidad de $P < 0,05$. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando Statistix 8.0 (Analytical Software, Tallahasee, USA).

4. RESULTADOS



4.1 PRODUCCIÓN DE UNA VACUNA INACTIVADA CONTRA ROTAVIRUS BOVINO

4.1.1 Caracterización y titulación de las cepas de Rotavirus bovino empleadas en esta tesis

Independientemente de la cepa de RVB multiplicada, el crecimiento del virus en línea celular MA104, ocurrió sin dificultad alguna y el proceso de optimización para obtención de mayores títulos virales por cada pase realizado, se alcanzó de manera rápida y sencilla. Cada cepa viral demostró poseer aspectos de replicación in vitro particulares, lo que conllevó pequeñas modificaciones en el protocolo de replicación para cada cepa viral. Tales aspectos están resumidos en la Tabla 3. El efecto citopático visible a microscopía óptica, se caracterizó por aumento de la granulosidad de la células, presencia de focos de redondeamiento celular que se agregan linealmente hasta cubrir totalmente la monocapa celular, observándose además vacuolización del citoplasma, con posterior desprendimiento y lisis celular.

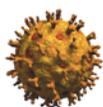


Tabla 3. Comparación de los aspectos de la replicación in vitro en cultivo celular estacionario de MA104, de las cepas de RVB usadas

	Infectividad en MA104	Enzima Proteolítica	Tiempo óptimo de cosecha (día post-infección)	Resistencia al proceso de descongelación
Cepa WC3 G6P[5]	Moderada,	Tripsina	5 ^{to}	Moderada, disminución del título viral con 2 descongelaciones
Cepa INDIANA G6P[5]	Alta	Pancreatina	2 ^{do} o 3 ^{ero}	Alta, disminución del título viral con 3 o más descongelaciones
Cepa B223 G10P[11]	Moderada	Pancreatina	3 ^{er} o 4 ^{to}	Moderada, disminución del título viral con 2 descongelaciones

El tiempo de aparición de efecto citopático depende de la MOI usada y del tipo de frasco inoculado. En cultivo estático en general, para la cepa WC3 se comienza a observar efecto citopático a través del microscopio óptico a partir de las 48 horas post infección. Entre el quinto y sexto día post inoculación se puede observar un efecto en el 90% de la monocapa celular. Se pudo determinar que el tiempo óptimo de cosecha de la suspensión viral generada, es a las 120 horas (5^{to} día) post infección (PI). Como se puede observar en la Figura 6, es allí donde obtuvimos el mayor título viral, independientemente de la MOI usada. También se determinó que entre valores de MOI 0.05 y 0.1 se mantienen un buen equilibrio entre número de partículas virales por células y se establece la relación a mayor valor de MOI mayor título viral obtenido.

Con respecto a la cepa INDIANA y B223, a pesar de no haber determinado el momento óptimo de cosecha viral como en el caso de la WC3, se pudo establecer que para la cepa INDIANA, entre las 48 y 72 horas post-infección, se podía observar total desprendimiento de la monocapa celular, dando altos títulos virales con una más rápida replicación, más eficiente maduración y/o liberación de esta cepa en la línea celular. Para la cepa B223 ocurrió levantamiento total de la monocapa al 4^{to} día post-infección, alcanzado buenos títulos virales al ser cosechado



entre 3^{er} y 4^{to} día post-infección. Cabe mencionar que estos tiempos fueron establecidos utilizando MOI de 0,1 y cultivo celular estacionario de MA104.

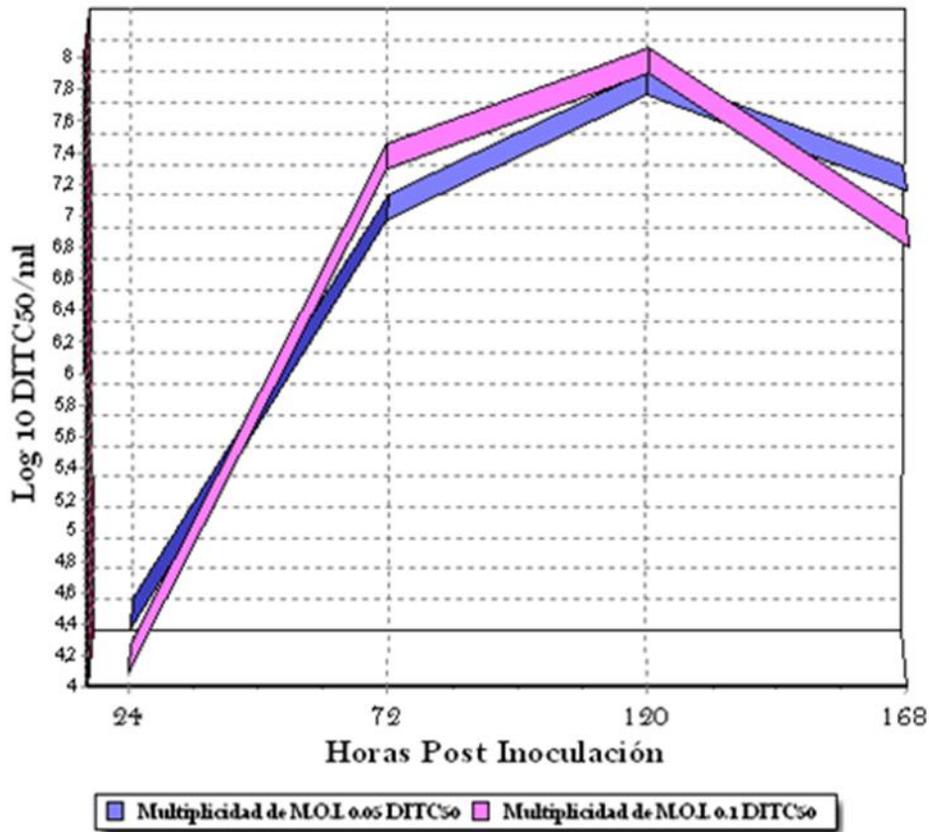
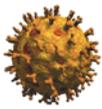


Figura 6. Curva de crecimiento de WC3 en células MA104, cultivo estacionario. Las muestras de suspensión viral fueron tomadas cada 48 horas post inoculación. A las 120 horas, (5^{to} día) se obtuvo el mayor título viral alcanzado con una M.O.I. de 0.01, que fue de $10^{7.9}$ DITC₅₀/mL.

4.1.1. Comparación entre los métodos de titulación viral

A fin de determinar las diferencias entre los dos métodos de cuantificación del título viral (DICT₅₀ y UFF), se realizó titulaciones simultáneas, a tres pasajes virales distintos, dos pertenecientes a la cepa WC3 y uno de la cepa INDIANA. No se observó una diferencia marcadas entre los títulos virales determinados por ambos métodos, para una misma cosecha viral. Los resultados obtenidos variaron



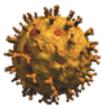
de igual manera entre cada técnica independiente de la cepa con la que se trabajó como lo muestra la Figura 7.

Los ensayos de $TCID_{50}$ y UFF difieren fundamentalmente en cómo medir la infectividad. El título $DICT_{50}$ mide indirectamente la distribución aleatoria de un cierto nivel infección viral en los pocillos, que se puede esperar bajo un conjunto de condiciones definidas. Un ensayo de Unidades Formadoras de Foco o de Unidades Formadoras de Placas por otro lado, mide directamente los eventos individuales de infección en una serie de condiciones definidas. Debido a esta diferencia y a que las condiciones utilizadas para los dos métodos de ensayos varían, una conversión exacta de los resultados de un ensayo a otro no es posible.

Suponiendo que se utiliza la misma línea celular para ambas mediciones, que no ocurra errores en las diluciones y que procedimientos diferentes no inhiben la formación de focos fluorescentes o de formación de placas, se puede establecer a través de la distribución de *Poisson* que un título $DICT_{50}/mL$, puede ser multiplicado por un factor de aproximado de 0,7 para predecir el número de PFU o UFF/mL. La interpretación de este resultado, sin embargo, solo es válida, si el protocolo de ambas mediciones ($DITC_{50}$ y UFF) se realizó en las mismas condiciones [110, 111, 112, 113]. Bajo este cálculo estadístico podemos decir, por ejemplo que una suspensión viral con un título de 1×10^5 $DITC_{50}$ es equivalente a $0,7 \times 10^5$ UFF, que es igual decir 7×10^4 UFF o $1 \times 10^{4,8}$ UFF. Esto se puede simplificar mejor, en que una titulación viral por UFF será siempre menor en $0.2 \log_{10}$ o 1,44 x, con respecto a la titulación determinada por $DITC_{50}$.

Como se observa, este concepto es contradictorio a lo que normalmente se piensa, que la titulación por $DITC_{50}$ será menor al compárala una titulación por UFF de la misma suspensión. Este razonamiento se basa en que la titulación por inmunofluorescencia es mucho más sensible que la $DITC_{50}$. También, se espera que la dilución donde se calculó 1 $DITC_{50}$ forme más de un foco fluorescente en la titulación por inmunofluorescencia, ya que existe una alta probabilidad que en los pocillos positivos del método $DITC_{50}$, pueda ser infectado por más de una UFF o UFP (promedio de 1,38 partículas). Pero la realidad es que calculando el promedio total, incluyendo los pocillos positivos y los negativos por distribución de *Poisson*, se determina 0.7 partículas, por unidad de $DITC_{50}$ [110, 111, 112, 113].

En nuestros ensayos la variación entre los resultados de los dos métodos, no llego a ser alta en ninguno de los casos (por encima a un orden de \log_{10}). Por el contrario, obtuvimos concordancia con lo anteriormente expuesto, donde la variación determinada se mantuvo entre los valores de 0,1 y 0.3 \log_{10} por título viral, siendo



siempre mayor la titulación cuantificada por $DITC_{50}$ (Figura 7). Nuestros resultados también concuerdan con los obtenidos por Robertso and Egerton, 1977 [114], donde al comparar títulos virales obtenidos por UFP y por $DICT_{50}/mL$ de una misma muestra, estos varían 0.1 a 0.2 \log_{10} UFP/mL.

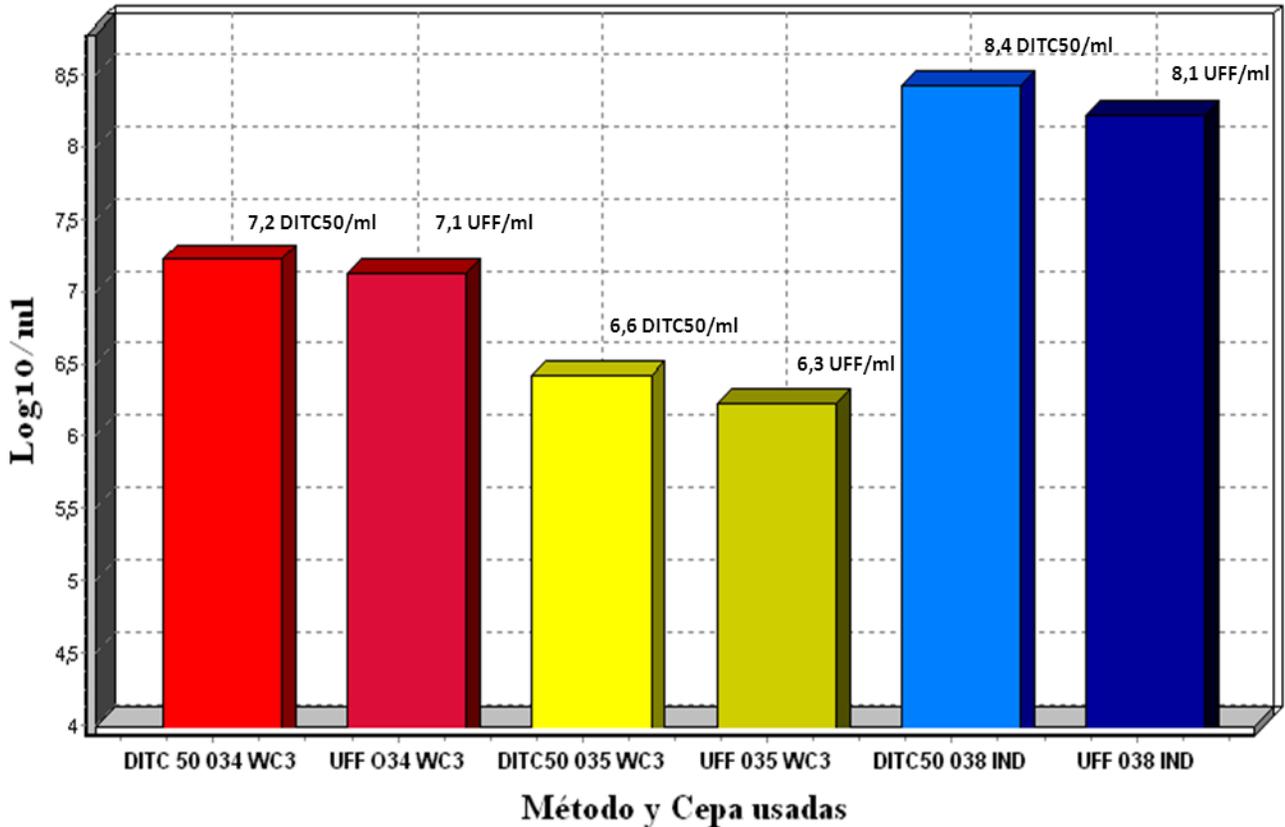


Figura 7. Grafico comparativo de los resultados obtenidos entre los dos métodos de titulación viral realizados. Cada color indica un mismo pase de la cepa indicada en el eje inferior. Los números 034, 035 y 038 indican la identificación de cada pase.

4.1.3 Genotipificación de cepas virales

Se realizó la técnica de RT-PCR *Heminested Multiplex*, para las proteínas VP7 y VP4, de las tres cepas de RVB, con las que se trabajó a lo largo del proyecto (WC3, INDIANA y B223). Para este ensayo se utilizó suspensiones virales del segundo o tercer pase, con el fin de confirmar tempranamente cada genotipo viral, antes de la elaboración de pases sucesivos. Cabe destacar que en el caso de la cepa vacunal



WC3 esta genotipificación se realizó en la suspensión viral correspondiente a la pre-semilla maestra viral, (con el que se produce la semilla viral maestra).

Para cada genotipificación de cada proteína VP7 y VP4 de cada cepa RVB, se esperan productos de amplificación RT-PCR *Heminested Multiplex* de tamaños diferentes (ver tabla 2 en Materiales y Métodos). En la Figura 8 se muestran 6 productos de amplificación RT-PCR *Heminested Multiplex*, correspondiente a los genotipos VP7 y VP4 de las tres cepas de RVB. Cada uno es identificado por su tamaño de banda característico. Así tenemos en el carril 1, la banda de 715 pb que corresponde con el G10 de la cepa B223. Para el 2^{do} y 3^{er} carril se observan bandas de 500 pb y de 167pb cada una, correspondientes para los genotipos G6 de las cepas WC3 e INDIANA. Posteriormente para los genotipos de VP4 se puede observar en el 6^{to} carril a la banda de 314 pb la cual corresponde con el P[11], de la cepa B223. De igual manera para los carriles 7^{to} y 8^{vo} se observa la banda de 550 pb correspondiente al genotipo P[5] de las cepas WC3 e INDIANA.

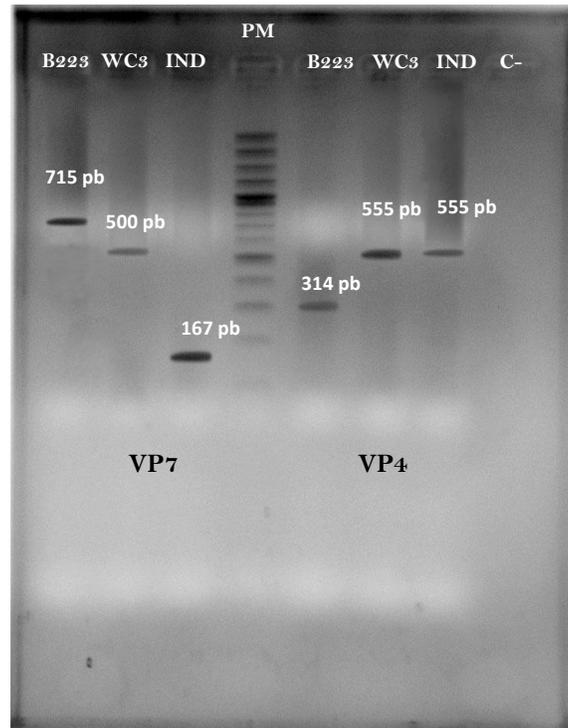
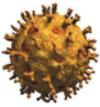


Figura 8. Tipificación de VP7 y VP4 mediante Multiplex RT-PCR. Las muestras se visualizan en gel de agarosa 1,5%. En la parte superior de cada carril se indica el nombre de la cepa correspondiente y el cuarto carril corresponde al marcador de peso molecular (PM).



4.1.4 Producción del Inóculo Viral Vacunal

El proceso que va de la producción del inóculo viral del RVB, hasta la formulación de las diferentes vacunas, fue elaborado en su totalidad, en las instalaciones del Laboratorio Santa Elena.

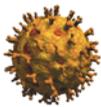
Dicho proceso es extenso y laborioso, además de estar conformado por diferentes etapas de producción (Figura 5. Materiales y Métodos). A pesar de la complejidad del mismo, todo se llevó a cabo sin contratiempo alguno, los productos y resultados obtenidos en cada una de sus etapas fueron los esperados y el proceso en general se realizó satisfactoriamente.

Una de las etapas más críticas de este, es el alcance de título viral adecuado en la cosecha de RVB para ser inactivado inactivar (cual debía ser mínimo 10^7 /mL DITC₅₀). Afortunadamente las suspensiones virales obtenidas para este fin, cumplieron con tal requisito. Cabe destacar que la multiplicación viral fue mucho más rápida y el tiempo de cosecha fue menor (48 horas) en comparación con el tiempo obtenido para la cepa vacunal anteriormente (5^{to} día), con el mismo valor de M.O.I. utilizado. Esto se debió a la diferencia el método de cultivo celular, a pesar de haber utilizado la misma línea celular, esta se replicó e infectó en botellas *Roller* a 0.01RPM, cambiando el tipo de cultivo estacionario utilizado en los ensayos de replicación viral anteriores. La distribución de las células sobre la superficie del vidrio en el sistema *Roller*, es mucho mejor que en los cultivos estacionarios; en él, se puede encontrar pequeñas áreas de crecimiento celular muy densas, dispersas en la superficie de la botella. Por otro lado este sistema se puede alcanzar una mayor densidad celular comparado con cultivos estacionarios.

Otro aspecto importante a mencionar es el uso de materias primas homogéneas y debidamente caracterizadas de origen definido y calidad aceptable.

4.1.5 Controles de Seguridad

Todos los controles de calidad realizados se basaron en las normas propuestas por entidades regulatorias como la Organización Mundial de la Salud (OMS) [115], el Código Federal de Regulaciones (CFR) [116], la Farmacopea de la Estados Unidos (USP XXIV) [118], la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) [117], y las Normas BPF (GMP) [79] quienes a nivel mundial establecen los parámetros necesarios para obtener productos de alta calidad. Además pertenecen a una parte de los ensayos establecidos en la política de control de calidad que aplica el laboratorio Santa Elena en la elaboración de sus productos.

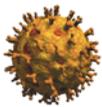


Todo los controles de esterilidad realizados a los diferentes sustratos (materia prima reactivos biológicos, bancos de células, banco de semillas virales, suspensiones virales, antígeno inactivado, vacuna formulada), después de sus respectivos tiempos incubación, no mostraron alteración alguna en su composición como turbidez, cambios de coloración, presencia de sedimentos que indicara crecimiento de algún agente adventicio que pudiera estar contaminado el sustrato testeado. Los resultados fueron satisfactorios.

Los resultados de control de Micoplasma realizados mediante PCR tanto para el MCB y PMVS fueron satisfactorios. No se observó aparición de bandas en el gel de agarosa de la corrida electroforética de los productos de PCR de cada una de estas muestras, que indicase contaminación por este agente bacteriano, al contrario del caso de la muestra control positivo de la prueba.

Todos los controles fenotípicos y genotípicos realizados sobre la cepa viral y la línea celular MA104 resultaron satisfactorios. No se observó alteraciones en las características de crecimiento, de viabilidad al almacenamiento, de replicación, de morfología celular, en pasajes posteriores de las células MA104. Tampoco se observó alteraciones en características de multiplicación y crecimiento en el sustrato celular de producción, tropismo tisular, viabilidad durante el almacenamiento y morfología del efecto citopático generado, de la semilla viral. Se tomó como parte de la evaluación genotípica, la verificación de genotipo de la cepa vacunal WC3 realizado a través del RT-PCR Heminested Multiplex.

En cuanto a los controles de inocuidad del antígeno viral inactivado, no se observó desarrollo de efecto citopático en los tres pasajes en ciego realizado a los antígenos virales inactivados en la línea celular MA104, indicando que no hubo fallas en el proceso de inactivación viral, siendo la prueba satisfactoria. La realización de la prueba de inocuidad del producto final en la especie destino, que en este caso es el bovino, fue realizada en el campo experimental Macondo del Laboratorio Santa Elena (departamento de Florida). Los resultados obtenidos fueron satisfactorios. No se observó ninguna reacción adversa a la vacuna en los animales inmunizados.



4.1.6 Formulación de tres tipos de vacunas: Monovalente Acuosa, Monovalente Oleosa y Polivalente Oleosa

La formulación y el proceso de adyuvado se realizaron en conjunto. Se mezcló los antígenos con el adyuvante y en el caso de las vacunas oleosas aparte también se realizó el proceso de emulsión. Por último, utilizando equipos automatizados de fraccionamiento y en condiciones asépticas, las formulaciones fueron fraccionadas en envases de multidosis. Seguidamente se almacenaron en cámara de frío hasta su posterior control y utilización. La relación de volumen de cada uno de los componentes vacúnales por dosis aplicada, de las tres diferentes formulaciones producidas, se muestran en la Tabla 4.

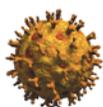


Tabla 4. Volumen por dosis de cada uno de los componentes vacúnales de las diferentes formulaciones producidas

Vacuna	Compuesto	Volumen agregado
Monovalente Acuosa	Antígeno vacunal (RVB WC3)	0.5 ml
	Hidróxido de aluminio	1.3 ml
	Solución fisiológica	1.2 ml
Volumen total por dosis		3 ml
Monovalente Oleosa	Antígeno vacunal (RVB WC3)	0.5 ml
	Adyuvac ⁵⁰	1.5 ml
	Solución fisiológica	1 ml
Volumen total por dosis		3 ml
Polivalente Oleosa	Antígenos vacunales (Rotavirus cepa WC3, Diarrea Viral Bovina tipo 1 y 2, Salmonella Entérica, E coli K99 y J5)	1 ml (0.25 ml Antígeno RVB WC3)
	Adyuvac ⁵⁰	1.5 ml
	Solución fisiológica	0.5 ml
Volumen total por dosis		3 ml



4.2 DESARROLLO DE MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DEL ANTIGENO ROTAVIRUS BOVINO Y LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-ROTAVIRUS.

Para la evaluación de las vacunas para Rotavirus Bovino generadas en esta tesis fue necesario implementar y poner a punto métodos para la detección de Rotavirus en las muestras de vacuna inactivada basado en la técnica de ELISA, así como métodos para la detección de Anticuerpos isotipo IgG y neutralizantes anti Rotavirus en las muestras de cobayos y bovinos basado en técnicas de ELISA y de Seroneutralización.

4.2.1 Detección del Antígeno Viral

La técnica ELISA KERI, fue el principal método utilizado para la detección de antígenos de Rotavirus Grupo A en muestras de suspensiones virales, vacunas formuladas y en muestras de materia fecal de terneros que participaron en el ensayo inmunización. Esta técnica fue reproducida en el Laboratorio Santa Elena siguiendo estrictamente el protocolo de elaboración y reactivos biológicos suministrado por la sección de Virus Entéricos del Instituto de Virología del INTA.

Tras pequeños ajustes realizados en los primeros ensayos, y después de haber adquirido cierta destreza en el protocolo, el método se reprodujo sin mayores contratiempos.

A través de la utilización muestras patrones como material fecal bovina control positivo (MF+), materia fecal bovina débilmente positiva (MFD+), materia fecal bovina control negativa (MF-), suspensiones virales de RVB WC3 con títulos virales mayores a 10^7 DITC₅₀/mL (Susp WC3), suspensiones de células Mock (Susp Mock), se evaluó la puesta a punto del ELISA KERI en el laboratorio.

En la Figura 9, se puede observar el comportamiento que tuvieron las muestras patrones, acordes a su condición en 6 repeticiones. A pesar que en las muestras MFD+, sus resultados estuvieron cerca del punto de corte, siempre se detectaron como positivas. En casos donde al calcular el punto de corte de la prueba este podía tener un valor un poco mayor a 0.2, aumentaba el valor de DOc de las MFD + también, nunca se mostraron como negativas francas. Algunas MF- presentaron valores de DOc cercano al punto de corte ($0,170 \pm 10$), pero en ningún caso se detectaron como falsos positivos.

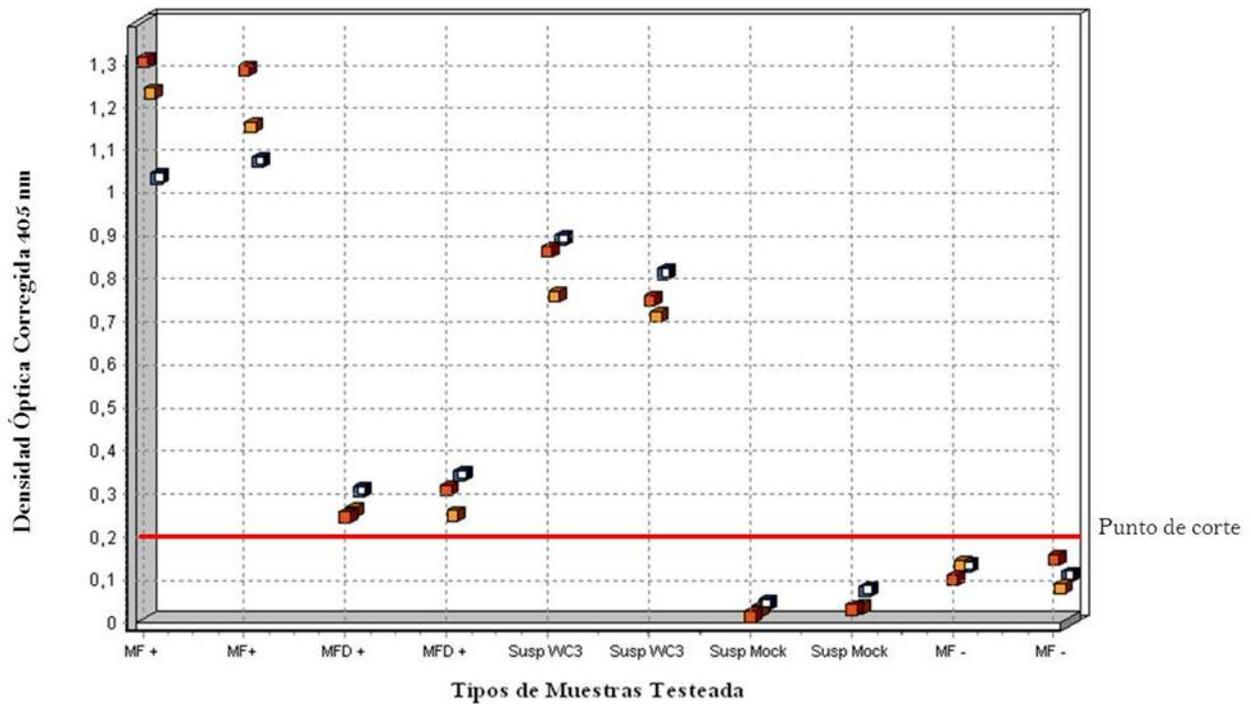
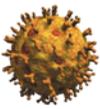


Figura 9 Gráfico de comportamiento de muestras patrones en ELISA KERI. Colores iguales de cuadros indican resultados obtenidos en una misma placa, de un mismo ensayo. Colores diferentes de cuadros indica resultados obtenidos en diferentes ensayos.

En base a lo observado la técnica de ELISA KERI demostró poseer características como:

- Precisión (valor real de la muestra patrón vs valor obtenido)
- Exactitud (variación de los resultados de acuerdo a la desviación estándar)
- Sensibilidad (detección de muestras débilmente positivas y detección de antígenos rotavirales en muestras positivas diluidas no hubo falsos negativos).
- Reproducibilidad (concordancia de los resultados de varias réplicas de las muestras dentro de una mismo ensayo y entre ensayos distintos)
- Especificidad (no hubo reactividad cruzada con muestras de MF positiva a Coronavirus bovino, con muestras de MF totalmente negativas ni con Susp Mock, no hubo falsos positivos)



- Robustez (no hubo cambios de los resultados en una misma muestra por efecto borde de las placas de ELISA, ni por diferentes analistas, ni por lotes diferente de soluciones).

La obtención de todos estos resultados nos llevó a considerar la técnica como validada y confiable.

4.2.1.1 Control de Masa antigénica Vacunal

Una vez que logramos la reproducción del método de una manera confiable, se procedió a la realización de la medición de la masa antigénica de las vacunas formuladas a través de este método. Lamentablemente solo se logró realizar con éxito la medición de la masa antigénica en la vacuna monovalente acuosa (VMA). Las otras dos formulación con adyuvante oleoso, no se logró buenos resultados, debido a problemas en la ruptura de la emulsión y obtención de la fase acusa de la vacuna.

Después de la separación del adyuvante, Hidróxido de aluminio del restos de los componentes de la formulación de la VMA (sobrenadante de la vacuna después del proceso de separación), se procedió a medir la capacidad de antígenos adsorbidos por el adyuvantes y se determinó si existe presencia de antígeno en el sobrenadante de la vacuna que no hayan sido adyuvados.

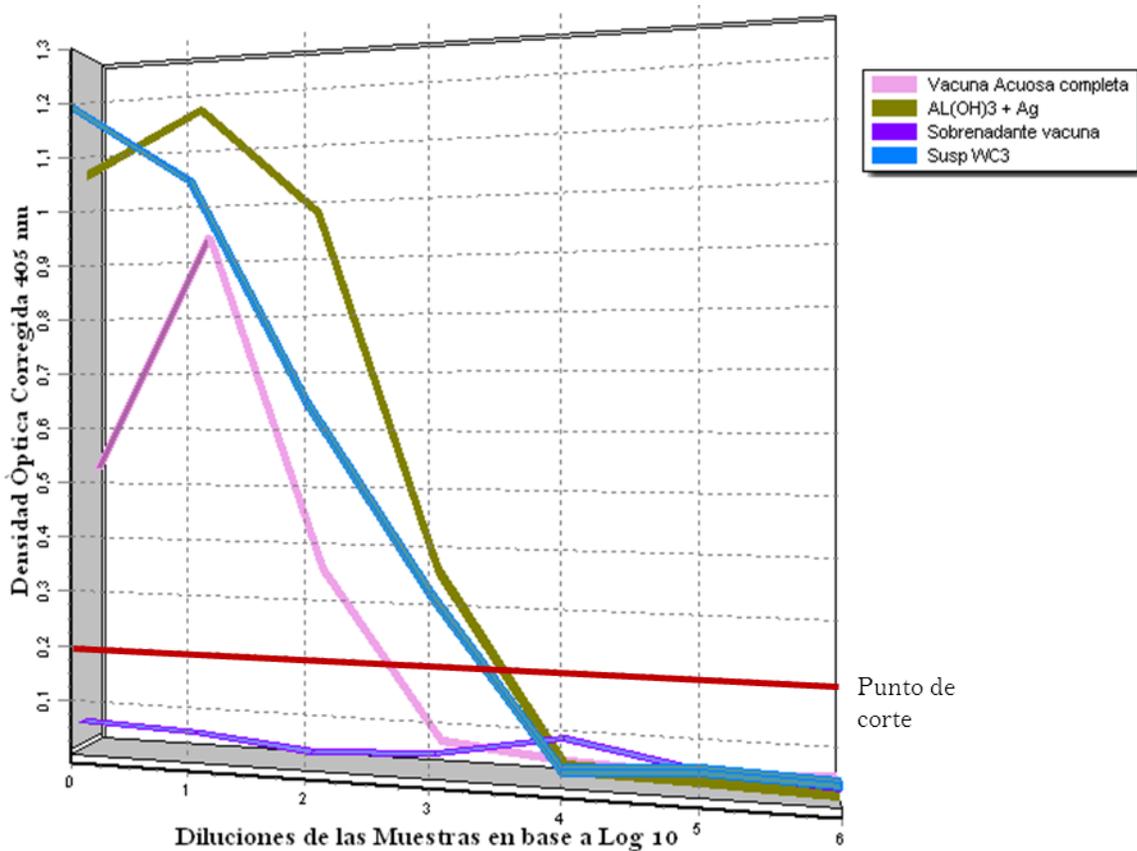


Figura 10. Medición de la masa antigénica en VMA, a través de la técnica de ELISA KERI.
La franja roja representa el punto de corte de la prueba es cual tiene un valor de DO de 0.2

En la figura 10, se pueden ver los resultados obtenidos en esta medición realizados para la vacuna completa, la muestra del Hidróxido de Aluminio separado de la formulación con antígeno adsorbido, la muestra del sobrenadante de la vacuna y por último una muestra de suspensión viral de WC3 control (con un título viral similar al que poseía la suspensión viral que dio origen al antígeno inactivado). Analizando los resultados, podemos decir inicialmente que todo el antígeno vacunal fue adsorbido por el adyuvante, ya que no se observó ningún tipo de detección de antígenos virales de RVB, en el sobrenadante de vacuna, inclusive en las menores diluciones. Por otro lado comparando el Hidróxido de aluminio con el antígeno adsorbido y la suspensión viral de WC3, observamos que estas 2 muestra se comportaron de manera semejante en nivel de detección de antígeno RVB.

Ambas se les detecto antígenos rotavirales hasta la dilución 10^{-3} . Con respecto a los resultados obtenidos de la muestra de vacuna completa se puede observar cierto



nivel de interferencia por los componentes vacunales, en la detección de antígenos, cuando la muestra no se ha diluido (DOc más baja). Otra diferencia fue que solo se detectó antígeno de RVB hasta la dilución 10^{-2} , es decir un log por debajo en comparación con la suspensión viral y la muestra del Hidróxido de Aluminio con el antígeno adsorbido.

Podemos decir que los resultados fueron óptimos, acorde a lo esperado, en el control de masa antigénica realizado para la VMA. La masa antigénica vacunal se encuentra en una concentración adecuada y no disminuyó su reactividad antigénica en el proceso de inactivación, por lo menos a nivel de poder ser detectada a través de este ensayo. Nos basamos en el hecho que se detectó en el adyuvante, antígenos virales de RVB a igual nivel que en una suspensión viral la cual no sufrió inactivación, ni de mezcla con otras sustancias químicas y reactivos químicos (adyuvante, hidróxido de Sodio, timerosal, solución fisiológica, entre otros), que pudiesen alterar la concentración y la configuración antigénica de las proteínas virales. Cabe recalcar que esta suspensión poseía un título viral similar al de la suspensión viral que dio origen a la masa antigénica vacunal.

4.2.1.2 Técnica de ELISA para la detección de antígeno de Rotavirus implementada en esta tesis.

Una vez lograda la puesta a punto del ELISA KERI con un alto grado de confiabilidad en los datos obtenidos, se procedió a realizar las modificaciones y adaptaciones de esta técnica para su desarrollo en el laboratorio.

En la Figura 11, se observan los resultados obtenidos al analizar las mismas muestras patrones por estos dos métodos.

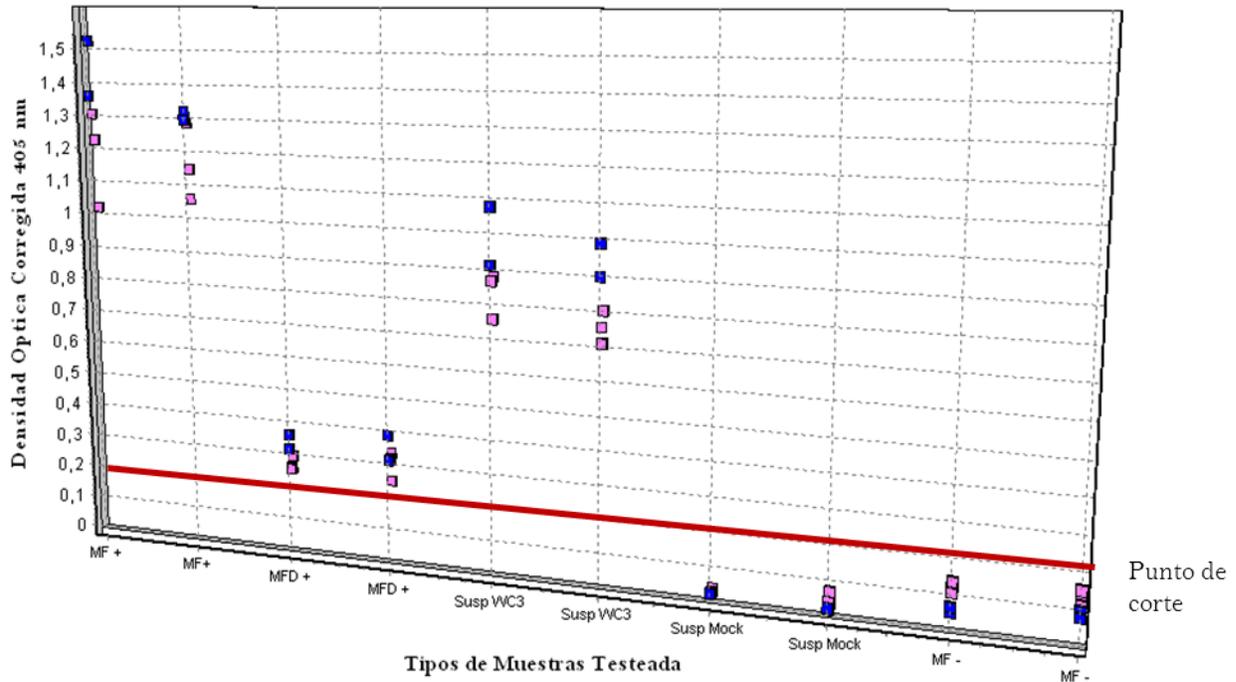
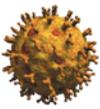
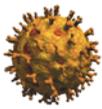


Figura 11. Comparación entre los resultados obtenidos por ELISA KERI y ELISA implementado en esta tesis (ELISA tesis), a partir de las muestras patrones. Los iconos de color rosado representan los valores de DOc obtenido en ELISA KERI. Los iconos de color azul representan los valores de DOc obtenidos en ELISA tesis. La franja roja representa el punto de corte de la prueba es cual tiene un valor de DO de 0,2

Entre las variaciones que se observan a nivel de los resultados obtenidos podemos mencionar un aumento de valores de DO en los pocillos de captura positiva, en las muestras positivas o débilmente positivas; una disminución de los valores de DO en los pocillos negativos, es decir, disminución de la inespecificidad en estas muestras. Los valores de DO en los pocillos positivos del control de PBS se mantuvieron con valores parecidos a los obtenidos con ELISA KERI, por ende se mantuvo el valor de punto de corte (0,200). La distancia entre los valores de la DO de los pocillos positivos y negativos fue un poco mayor, sobre todo en las muestras de antígenos rotavirales, así que en las muestras MFD+ se obtuvo valores de DOc más altos, es decir la prueba es más sensible para estos casos. Los valores de DO en los pocillos ya sean de captura positiva o de captura negativa, en las muestras negativas, presentaron disminución en sus valores también, pero al obtener la DOc, sus valores fueron similares a los obtenidos con ELISA KERI. No hubo identificación de falsos positivos en este tipo de muestras.



En resumen tanto en el ELISA puesto a punto en esta tesis, como en el ELISA KERI, se obtuvieron resultados óptimos, lográndose para esta última, un nivel de validación aceptable que permitió utilizar esta técnica para la elaboración de ensayos a lo largo de este proyecto, como la medición de la masa antigénica vacunal explicados anteriormente y la detección de antígenos de RBV en muestras de heces de terneros, que sera mencionado más adelante.

Por último, a partir del ELISA para la detección de antígeno de Rotavirus, implementado en esta tesis basada en el ELISA KERI original, se generó un instructivo con el protocolo de elaboración paso a paso de esta técnica, enmarcado bajo el Sistema de Control de la Calidad del Laboratorios Santa Elena. Anexo 8.1 Constancia de elaboración de Instructivos Bajo el Sistema de Control de Calidad del Laboratorio Santa Elena para las técnicas de ELISA estandarizadas para la tesis, ELISA detección de Antígenos de RVB y ELISA para la detección de Anticuerpos IgG anti-RVB.

4.2.2 Detección de Anticuerpos Anti-Rotavirus

4.2.2.1 Técnicas de Seroneutralización

Para medir los títulos de anticuerpos neutralizantes (AcN) presente en las muestras de sueros de cobayos y sueros de bovinos provenientes de las pruebas de inmunogenicidad vacunal, se desarrolló una técnica de seroneutralización por Dosis Efectiva 50 (DE_{50}), basándonos en el método descrito en Manual de diagnóstico de Enfermedades Virales, Rickettsias, Clamidia [119], así como el utilizado por Murakami, y colaboradores 1983 [120] y Sato, y colaboradores 1981 [121], con algunas modificaciones. Cabe mencionar que esta técnica fue desarrollada y se originó a partir de esta investigación. Se contó con sueros patrones con la participación de muestras patrones como: suero de cobayo positivo (SC+), suero de cobayo débilmente positivo (SCD+), Suero de cobayo negativo (SC-) Suero de bovino positivo (SB+), los cuales fueron donadas por la sección de Virus Entéricos – INTA. Con respecto a las cepas de RVB, para la estandarización del método se utilizó la cepa WC3. Se consideró como estandarizado cuando la técnica demostró tener buenas propiedad de validación y confiabilidad (precisión, exactitud sensibilidad, reproducibilidad especificidad robustez).

Por otro lado, como se mencionó en Materiales y Métodos, se estandarizo la técnica de Seroneutralización por Reducción de Foco Fluorescente (RFF). Para la estandarización de esta técnica se contó con un anticuerpo policlonal anti-RVB conjugado con isotiocianato de fluoresceína, suministrado por sección de Virus Entéricos – INTA, aparte de los ya mencionados sueros patrones. El proceso de



desarrollo y la estandarización se realizó de manera rápida y sencilla, obteniendo resultados fiables y con buena repetitividad. Una vez alcanzado esto, se procedió a determinar la dilución de trabajo más óptima para el policlonal anti-RVB conjugado con fluoresceína (PA1-73014), adquirido comercialmente.

Se realizó la estandarización del RFF para poder determinar las diferencias entre los resultados obtenidos por seroneutralización por DE_{50} y RFF, motivado a que este método es el empleado por la sección de Virus Entéricos, Instituto de Virología del INTA – Argentina, el cual es nuestro principal referente. Es importante realizar esta comparación de resultados, ya que esta es una manera de validar nuestro ensayo de DE_{50} y de conocer el alcance que tiene el mismo con respecto a propiedades como sensibilidad, especificidad.

Se realizó la medición de los títulos AcN, por ambas técnicas, solo en las muestras de suero de cobayos obtenidas al día 60 PV. Los resultados obtenidos los podemos observar en la figura 12.

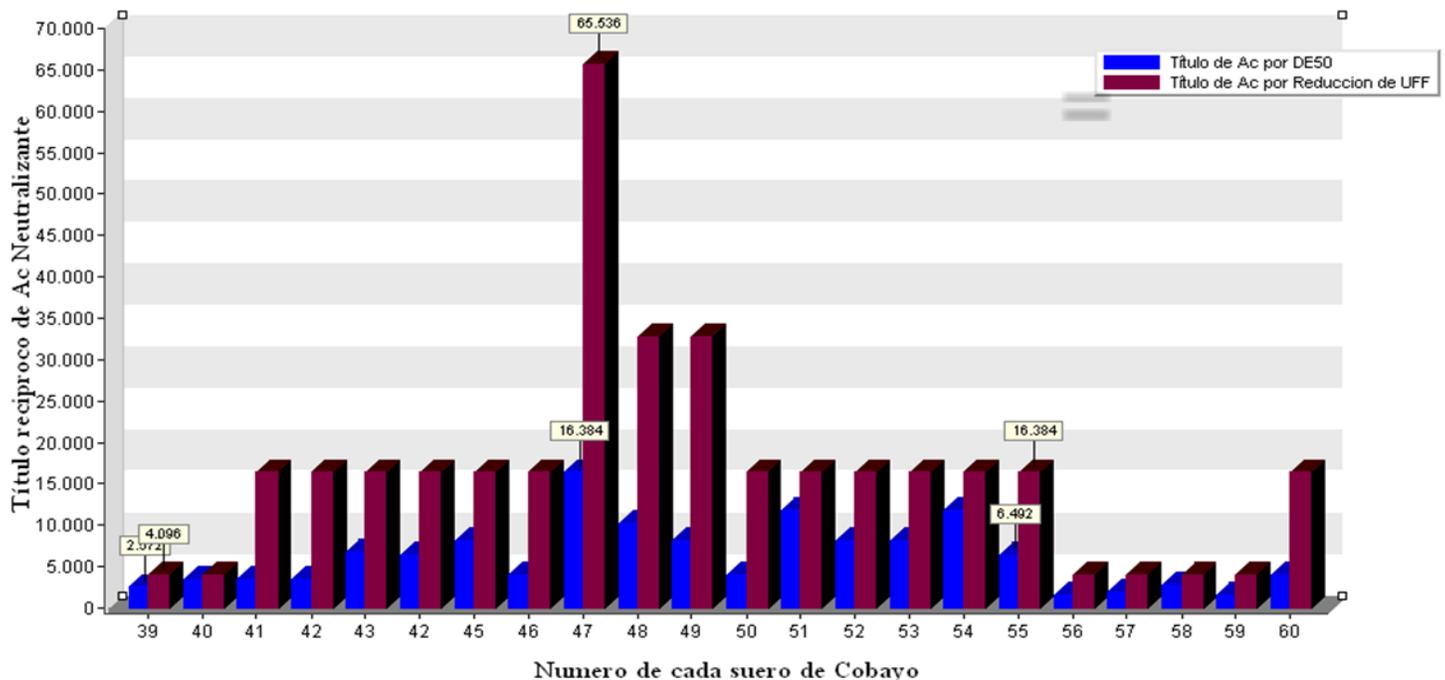


Figura 12. Comportamiento de títulos de Ac SN calculado para cada suero de cobayo del día 60 a través de las técnicas DE_{50} y RFF. En algunas barras se muestran etiquetas con los valores de título de AcN calculados.



En todos los casos el título de AcN calculado por RFF, fue mayor que para el calculado por DE_{50} , obteniéndose títulos hasta 4 veces mayores, (una dilución por encima, diluciones realizada en base a 4). Las mayores diferencia de los títulos de AcN calculados por ambos métodos, fueron observadas en aquellos sueros con títulos de AcN mas altos.

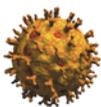
Si consideramos los resultados obtenidos al comparar entre si las dos técnicas de titulación viral, explicado anteriormente (punto 4.1.2) podemos decir que en 200 UFF, existe aproximadamente 300 $DITC_{50}$ (siguiendo la distribución Poisson, hay 70 UFF en 100 $DITC_{50}$), los que nos lleva concluir que en la técnica de Reducción de UFF los sueros se enfrentaron a una concentración viral 3 veces mayor a la enfrentada para DE_{50} . Aun así los títulos obtenidos por RFF fueron mayores, los que nos corrobora la mayor sensibilidad de este método [114]. Hay que tener en cuenta también que para DE_{50} , solo se consideraba que el pocillo neutralizo al virus, cuando no presentaba ningún efecto citopático, lo que conlleva a no contabilizar aquellos pocillos que neutralizaron medianamente al virus como pocillos protegidos, traducándose esto a una mayor exigencia al momento de calcular el título de anticuerpo por Reed y Muench [87].

4.2.2.2 Técnica de ELISA para detección de anticuerpos IgG totales anti-Rotavirus.

Las acciones seguidas fueron muy similares a las realizadas en la ELISA detección de AG de RVB, mencionadas en el punto 4.2.1. La variante estuvo en que protocolo de ELISA utilizado para la medición de los Ac IgG totales para los ensayos del proyecto, fue el protocolo puesto a punto para esta tesis y no el del INTA, como en el caso anterior

Una vez que se logró la reproducción del protocolo INTA, en condiciones lo más parecidas a las originales, (con reactivos biológicos suministrado por sección de Virus Entéricos - INTA) se procedió a la utilización de este protocolo para estandarizar y optimizar el nuevo grupo de Anticuerpos policlonales comerciales que serían empleados en el protocolo puesto a punto en esta tesis. Se contó al igual que en el caso de las técnicas de seroneutralización, con la participación de muestras patrones mencionadas.

Como en ocasiones anteriores, se consideró como estandarizado este protocolo cuando la técnica demostró tener buenas propiedades de validación y confiabilidad (precisión, exactitud sensibilidad, reproducibilidad especificidad robustez). Con el



tiempo su uso confirmó tales propiedades, a través de la introducción de muestras patrones entre las muestras problemas en ciertos momentos y a esto se sumó los acordes resultados obtenidos en controles positivos y negativos de cada placa ensayada.

Por otro lado, al introducir a este protocolo un nuevo factor de alta variabilidad biológica, como pueden ser las muestras bovinas (suero, calostro, leche y materia fecal), el mismo respondió de manera congruente con las muestras de referencia y después de unos ajustes en la preparación de las muestras problemas, se obtuvieron resultados con un buen nivel de validación.

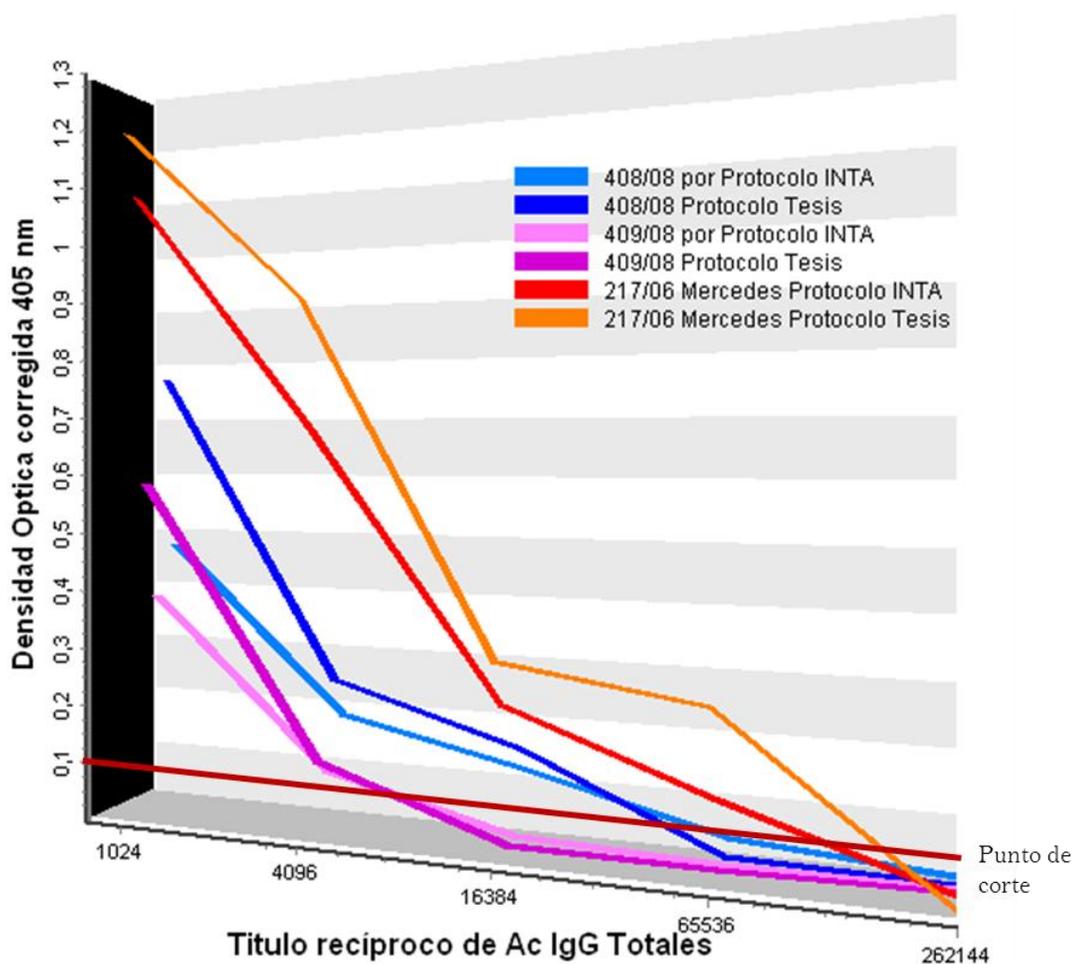
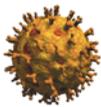


Figura 13. Comparación de títulos de Ac IgG totales de muestras patrones obtenidas a través de los protocolos de ELISA del INTA y el protocolo puesto a punto en esta tesis. La franja roja representa el punto de corte de la prueba es cual tiene un valor de DO de 0.1



En la Figura 13, podemos ver el comportamiento similar que tuvieron las muestras patrones en los dos protocolos establecidos. Se muestran los resultados de tres muestras patrones usados (408/08, 409/08, 217 mercedes). Cada una representa a un SC+ SCD+ y a un SB+ respectivamente. Ambos protocolos coincidieron con el título de Ac IgG totales que estas tienen como referencia y con el valor de punto de corte de la prueba.

A partir del ELISA para la detección de anticuerpos anti Rotavirus (IgG totales), adaptado del ELISA de referencia (INTA) y puesto a punto en esta tesis, se generó un instructivo con el protocolo de elaboración paso a paso de esta técnica, enmarcado bajo el Sistema de Control de la Calidad de Laboratorios Santa Elena Anexo 8.1 Constancia de elaboración de Instructivos Bajo el Sistema de Control de Calidad del Laboratorio Santa Elena para las técnicas de ELISA estandarizadas para la tesis, ELISA detección de Antígenos de RVB y ELISA para la detección de Anticuerpos IgG anti-RVB.

4.3 EVALUACIÓN DE LOS TÍTULOS DE ANTICUERPOS EN LOS ANIMALES VACUNADOS Y VERIFICACIÓN DE LA POTENCIA VACUNAL.

4.3.1 Evaluación de la respuesta de anticuerpos IgG Totales anti-RVB en cobayos vacunados.

En la figura 14, están representados los resultados obtenidos de promedios del \log_{10} de los títulos de anticuerpos IgG totales en los cobayos inmunizados. Luego del análisis de los diferentes grupos de cobayos vacunados podemos observar que el grupo de cobayos inmunizados con VMA fue el que presentó mayor promedio alcanzado para el día 30 post vacunación (PV), el grupo VPO fue el que presentó el menor promedio para ese momento, existiendo diferencia significativa entre estos dos grupos para esa fecha.

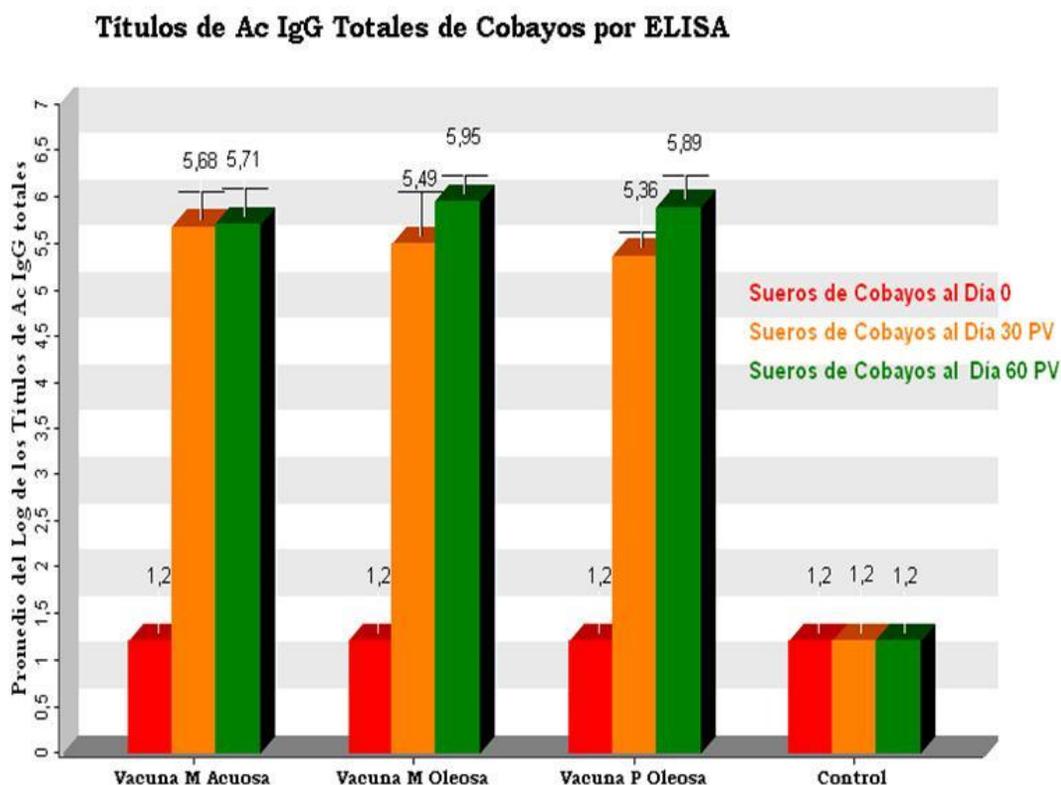


Figura 14. Títulos de Anticuerpos IgG totales anti-Rotavirus en suero de cobayos vacunados. Las barras representan el promedio del \log_{10} los resultados obtenidos en cada grupo de cobayos inmunizados con las diferentes formulaciones vacunales. La detección de anticuerpos anti rotavirus IgG totales, fue realizada mediante la técnica de ELISA puesta punto en esta tesis. A los sueros negativos se les asigno un título de 16 por ser 1/16 la dilución más baja empleada. Se representa la desviación estándar.

Para el día 60 PV el mayor nivel promedio del \log_{10} de los títulos de IgG totales ocurrió en el grupo VMO, seguido por el grupo VPO. Este último también fue el que mostró más nivel de seroconversión, de 3,5 veces mayor entre los días 30 y 60 PV, existiendo diferencia significativa entre estos dos valores para este grupo. El grupo VMA fue el que presentó menor seroconversión de 1,2 veces mayor entre estos dos días. El grupo VMO presentó una seroconversión de 1,6 veces mayor entre el día 30 y 60 PV. No existió diferencia significativa entre el nivel de conversión obtenido, para estos dos grupos. Existe diferencia altamente significativa ($p < 0.01$) entre los 3 grupos de cobayos vacunados y el grupo control para los días 30 y 60 PV.

Se calculó el \log_{10} de los títulos de IgG de cada animal y a partir de estos valores se determinó el promedio para grupo vacunal para compararlos con lo establecido, por



la sección de Virus Entéricos, Instituto de Virología del INTA - Argentina, como valor mínimo que debe tener un control de potencia satisfactorio. Ellos indican que los cobayos vacunados deben alcanzar títulos de IgG totales mayores o iguales a $4.47 \log_{10}$, medidos a través de la prueba de ELISA, para poder ser considerada la potencia de la vacuna como satisfactoria (Dra. Parreño, comunicación personal, datos no publicados). Este valor fue establecido por esta sección a través de un estudio estadístico previo, donde analizan y comparan el nivel de correlación que existe entre la seroconversión bovina y la seroconversión del cobayo, a manera de certificar que la repuesta inmunológica del modelo cobayo garantiza una protección adecuada en el Bovino vacunado contra RVB [82].

Tabla 5. Promedio del \log_{10} de los títulos de IgG totales desarrollados en cobayos

	Monovalente Acuosa	Monovalente Oleosa	Polivalente Oleosa
Día 30 PV	5,68	5,49	5,36
Día 60 PV	5,66	5,95	5,89

Como podemos observar en la Tabla 5, todos los valores obtenidos para cada grupo de cobayo vacunados ya sea en el día 30 o en el día 60 PV, superaron el límite establecido para considerar el control de potencia vacunal satisfactoria. La VMO fue la que obtuvo el mayor valor, el cual es casi idéntico al obtenido por VPO para el día 60 PV. Por otro lado la VMA fue la de menor valor para ese mismo momento. Estos 3 resultados presenta más de $1 \log_{10}$ superior con respecto al establecido $4,47$ (Figura 15).

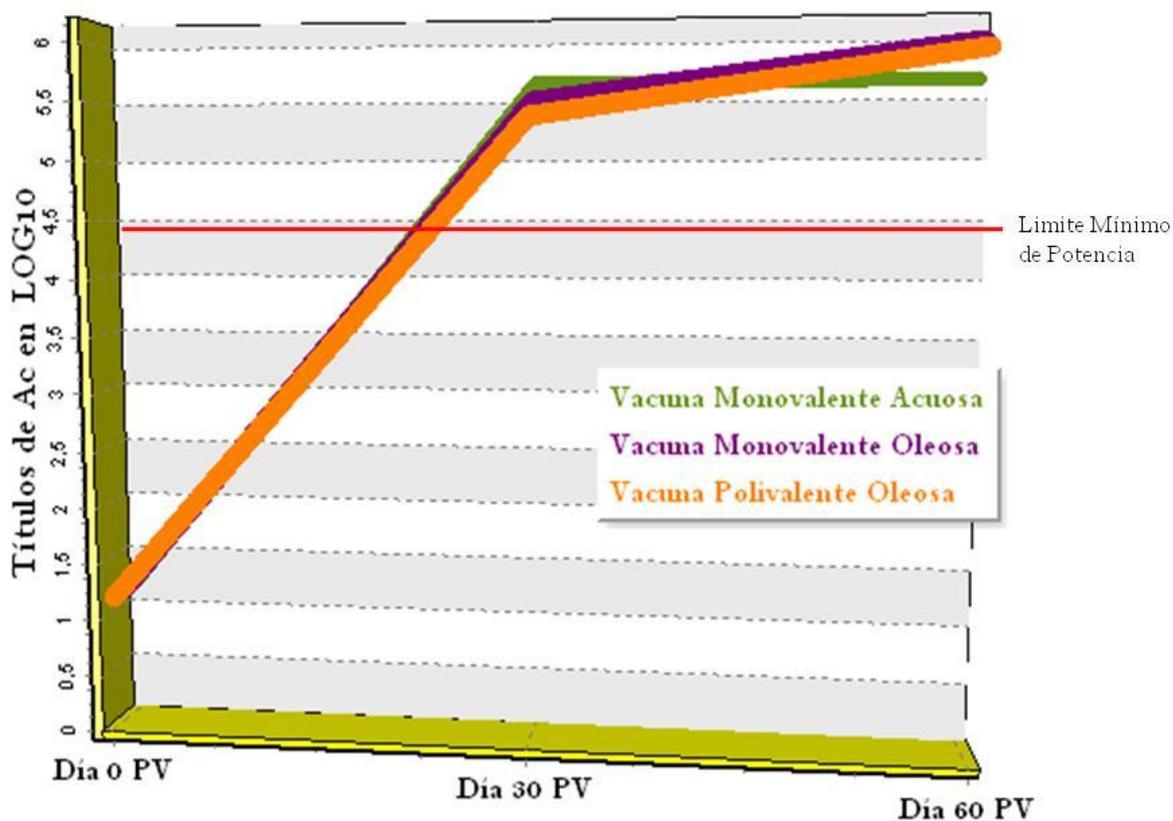
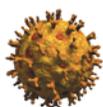


Figura 15. Representación gráfica del límite mínimo de potencia vacunal establecido y los resultados de los promedios del \log_{10} de los Título de anticuerpos IgG totales obtenidos en los 3 grupos de cobayos vacunas. Estos fueron medidos a través de la técnica de ELISA puesta punto en esta tesis. La franja roja indica el punto de corte del limite es cual tiene un valor de 4,47 \log_{10} .

4.3.2 Evaluación de la respuesta de Anticuerpos neutralizantes anti-RVB en cobayos vacunados.

La evaluación de la respuesta de anticuerpos neutralizantes en suero de cobayos se llevó a cabo mediante la técnica de seroneutralización por DE_{50} luego de la puesta a punto de dicha técnica. Los resultados obtenidos a través de esta técnica se pueden observar en la Figura 16, donde se muestra el nivel de seroconversión de los títulos de AcN de cada grupo de cobayos vacunados. El grupo vacunado con la VPO fue el que alcanzo el más bajo nivel de seroconversión, a los 30 días PV. Este valor fue 2,5 veces mayor al día 60 PV.

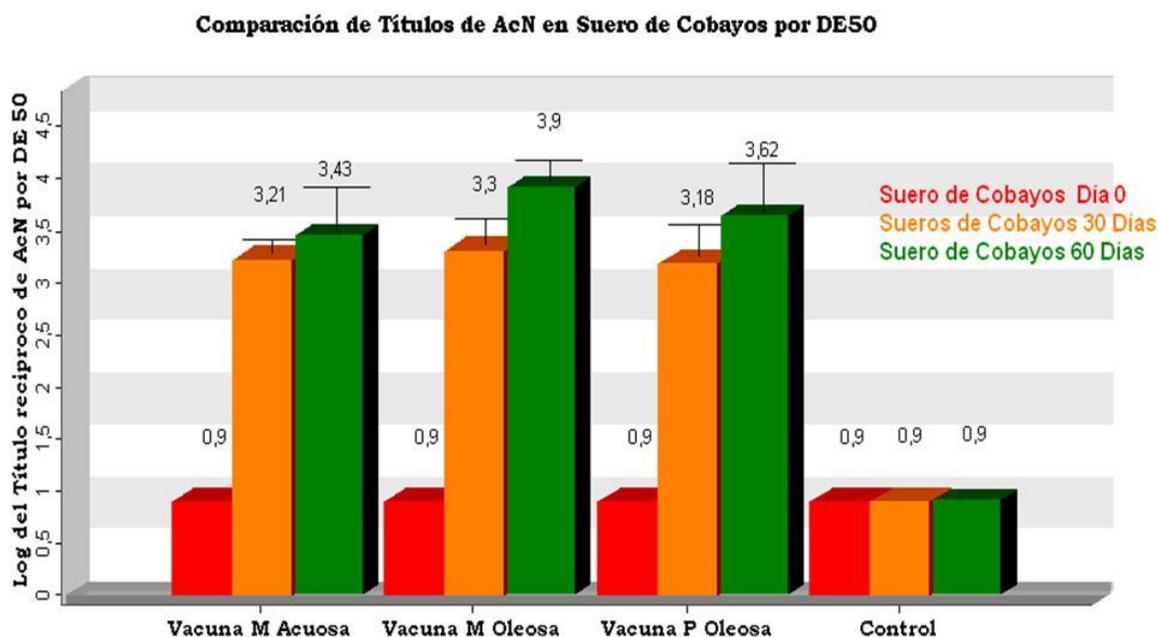
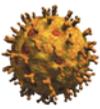


Figura 16 Títulos de Anticuerpos Neutralizantes anti-Rotavirus en suero de cobayos vacunados. Las barras representa el promedio del \log_{10} de los títulos de AcN de los diferentes grupos de cobayos vacunados, a los días 0, 30 y 60 PV, calculados a través de DE₅₀. Los sueros negativos se les asigno un título de 8 por ser 1/8 la dilución más baja empleada. Se representa la desviación estándar

Con respecto a la Vacuna Monovalente Oleosa (VMO), sus resultados fueron los que alcanzaron mayores títulos de anticuerpos neutralizantes para el día 30 PV, este valor fue 3 veces mayor al día 60 PV. Para la VMA, su seroconversión fue menor al compararla con el grupo vacunado con VMO, pero mayor que al grupo VMA para el día 30 PV, presentando un aumento 2 veces mayor para el día 60 PV. No existe diferencia significativa $p < 0,05$, entre la seroconversión alcanzada por todos los grupos vacunas a los 30 días. En el caso del día 60 PV, entre los grupos de vacuna oleosa no hubo diferencia significativa, ni para VPO vs VMA, pero si en los resultados obtenidos entre VMA y VMO.

También hubo diferencia significativa entre: las seroconversión ocurrida entre los días 30 y 60 PV para todos los grupos vacunales y entre todos los grupos vacunas a los 30 y 60 PV con respecto al grupo control, como era de esperarse.



Asimismo, se evaluó los sueros de cobayos del día 60 PV mediante la técnica de RFF. El comportamiento de los datos fue parecido al visto con DE_{50} , el promedio del \log_{10} de los título, fue mayor para VMO, la diferencia estuvo en los promedios de VPO y VMA que fueron casi iguales, lo que se correlaciona con la diferencia no significativa entre estos dos grupo en DE_{50} (Figura 17). El resto del comportamiento estadístico fue igual que en la medición por DE_{50} para el día 60 PV. Los promedios de títulos de AcN por grupo de vacunas, fueron de 2 veces (grupo VPO) a 3 veces (grupos VMA y VMO) mayores, comparados con los promedio calculado por DE_{50} .

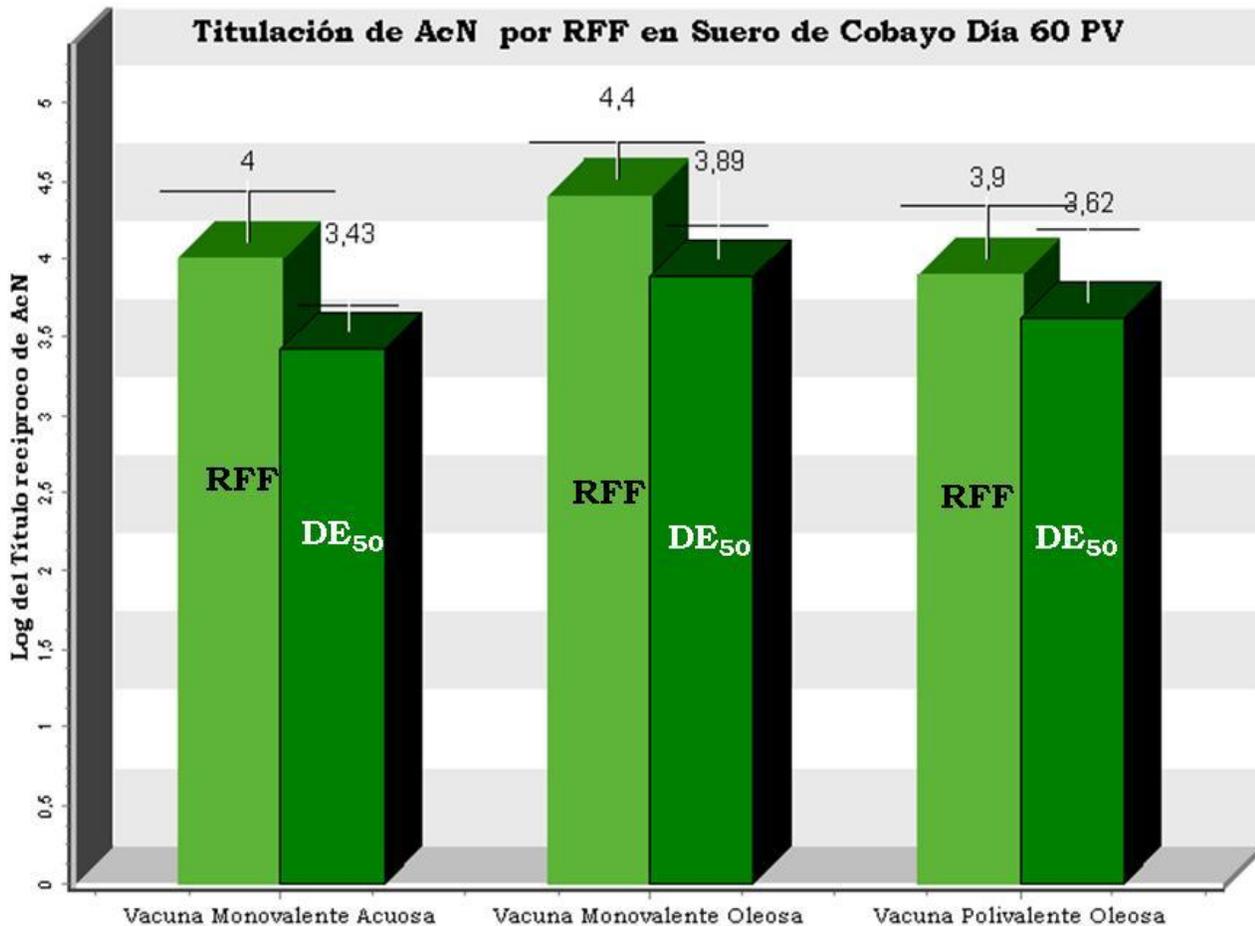
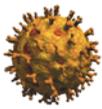


Figura 17. Títulos de Anticuerpos Neutralizantes anti-Rotavirus en suero de cobayos vacunados. Las barras representa el promedio de títulos de AcN de los diferentes grupos de cobayos vacunados, a los 60 PV, calculados a través de la técnica RFF y DE_{50} Se representa la desviación estándar y promedio de títulos AcN de cada grupo.



4.3.3 Detección de la Reactividad de los Anticuerpos Vacunales de cobayos hacia las proteínas de RVB.

A fin de analizar la reactividad de los anticuerpos presentes en los sueros de cobayos vacunados, hacia las distintas proteínas virales, antigénicas y estructurales de la cepa WC3, se decidió realizar el ensayo de Western Blot (Wb).

En la figura 18 se observa los resultados obtenidos luego del análisis de los sueros de cobayos del día 60 PV enfrentados al antígeno vacunal (RVB cepa WC3).

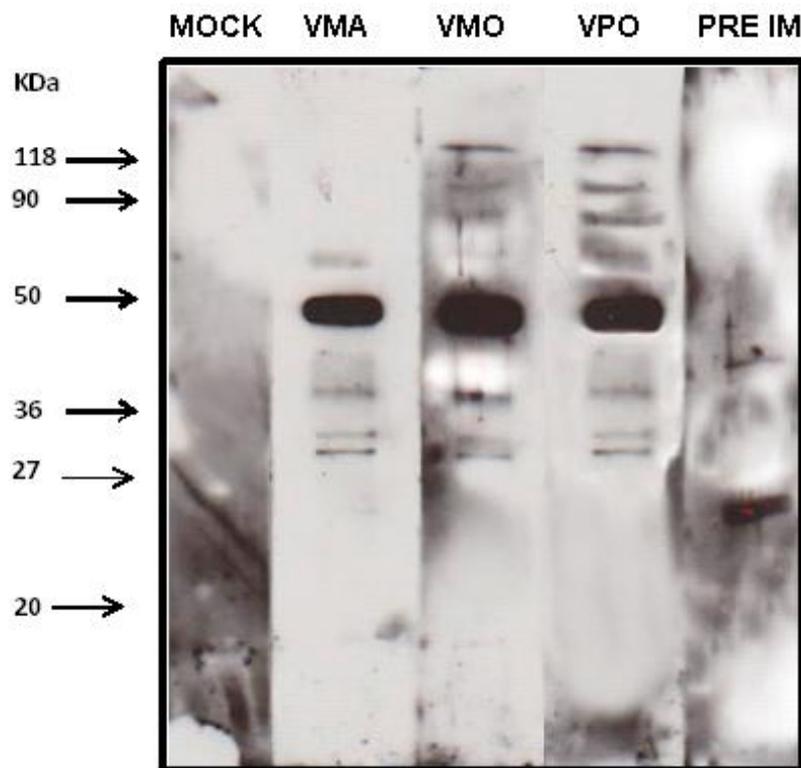
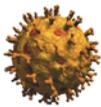


Figura 18. Reactividad de los sueros de cobayo frente al antígeno vacunal. En los diferentes carriles se muestra la reactividad obtenida por Western blot frente al antígeno viral (cepa WC3) de los grupos de sueros del día 60 de cobayos inmunizados con las diferentes formulaciones vacunales (carriles VMA, VMO, VPO) y de un grupo de sueros de cobayos previo inmunización (carril PRE IM). El carril MOCK corresponde a células MA104 sin infectar como antígeno enfrentadas al grupo de sueros de cobayos vacunados con la formulación VPO. La posición de los marcadores de peso molecular (KDa) es indicada a la izquierda.



Como podemos observar todos los grupos de sueros inmunes generados, independientemente de la formulación vacunal, reconocen proteínas del antígeno viral (WC3) que no reconoce el suero pre inmune. Además esta reactividad no ocurre con el suero VPO frente a antígeno MOCK por lo cual indica que esta reactividad no estaría ocurriendo frente a componentes celulares o del medio de cultivo. Si bien no se contó con anticuerpos control para cada una de las proteínas de Rotavirus, podemos a través del peso molecular característico localizar e identificar la posible pertinencia de cada una de las proteínas rotavirales presentes en el ensayo.

Tomando en cuenta que pueden existir pequeñas variaciones en los pesos moleculares de las proteínas, los cuales pueden ser influenciados por factores como la cepa viral empleada, el método de purificación del virus, nivel de desnaturalización de la proteína y la concentración de gel de poliacrilamida, entre otros, los pesos moleculares vistos en cada una de las bandas identificadas por los grupos de sueros, concuerdan con los pesos de las proteínas rotavirales estructurales que allí se visualizan. Así tenemos que las bandas observadas en los carriles de sueros de cobayos vacunados (VMA, VMO y VPO) de tamaños de 120 KDa , 95 KDa, 88KDa, 58KDa, 45KDa, 39Kda, 34KDa, 28KDa aproximadamente, corresponderían a las proteínas VP1, VP2, VP3/4, VP5, VP6, VP7^G, VP7, VP8, respectivamente. También observamos que las intensidades de banda esta relacionadas con la cantidad que se encuentran las mismas, en conformación de la masa proteica del virión y también a su antigenicidad. Para la VP6 que es la principal proteína estructural constituyendo aproximadamente el 50% de la proteína total del virión [6], y la cual es altamente inmunogénica se observa la banda de mayor intensidad, y es claramente vista en los tres carriles.

La VP7 también se observa con cierta intensidad siendo esta la principal proteína de la capa externa. Dos bandas se pueden atribuir a esta proteína, la banda de 38KDa que pudiese pertenecer a la VP7^G en su forma glicosilada y a la 34 KDa VP7 sin glicosilación. El reconocimiento de estas dos formas indica que los anticuerpos pudieron reaccionar con los epítopes antigénicos de estas proteínas independientemente del proceso de desnaturalización del SDS-PAGE y del estado de conformación en que se puede encontrar la VP7.

Se puede intuir la presencia de VP2 observada con poca intensidad, junto a la VP1 y VP3/4 en los carriles VMO y VPO que corresponde a sueros provenientes de vacunación con adyuvante oleoso. Estos sueros fueron los que presentaron mayores títulos de anticuerpos, tanto IgG como AcN en comparación con los sueros de la formulación con adyuvante acuoso. Posiblemente esto sea una de las causas de la



poca reactividad que demostraron tener estos sueros, con estas proteínas. Por otro lado existen muy pocas copias de las VP1 y VP3 en el virión, lo que aumenta la dificultad de ser reconocida por los sueros de VMA. Para confirmar estos resultados es imprescindible contar con anticuerpos control que reconozcan específicamente cada una de estas proteínas.

Por otra parte proponemos que la banda de 88 KDa pudiera ser VP4 ya que esta proteína tiene un tamaño de peso molecular similar. Aunque también se observó bandas correspondientes a la VP4 en su forma clivada la cual da origen a VP5 (banda de 58Kda) y VP8 (banda de 28KDa).

4.3.4 Estudio de la reacción cruzada entre cepas homologas y heterólogas a la WC3 en cobayos vacunados.

A través del uso de la técnicas de seroneutralización, DE_{50} o RFF se realizó un estudio sobre el nivel de reacción cruzada que ofrecía los sueros de cobayos de los 3 grupos vacunales, al ser enfrentado con un cepa de RVB homologa (INDIANA G6P[5]) y una cepa heteróloga (B223 G10 P[11]) a la cepa WC3, como otra manera de medir el grado de respuesta inmunológica principalmente seroneutralizante que se obtuvo en los cobayos inmunizados.

4.3.4.1 Cepa RVB INDIANA

Primeramente se realizó el enfrentamiento de los sueros de cobayos con la cepa homologa INDIANA. Este ensayo se realizó a través de los dos métodos de seroneutralización (DE_{50} y RFF). Los datos mostrados en la tabla 6, muestran los resultados obtenidos a través de RFF, ya que esto fueron muchos más homogéneos y óptimos que los obtenidos a través de DE_{50} .

Observamos que la diferencia de títulos AcN alcanzados entre estas dos cepas es mucho más alta de lo esperado. En nuestro caso y como se indica en el datos entre paréntesis de la Tabla 6, los títulos de AcN obtenidos con la propia cepa WC3 fueron hasta 16 veces mayores a los obtenidos con cepa INDIANA, (VMA). El limite serológico establecido para considerar cepas homologas o relacionadas entre sí, es de una diferencia de menor o igual a 20 veces, entre títulos de AcN [17, 18, 122, 123, 124]. A pesar de estar dentro del rango de homología establecido, no se esperaba el nivel de discrepancia entre los titulo AcN obtenidos. Inclusive porque, en estudios anteriores [72, 82, 125], la diferencia entre cepas G6P7[5] y



G6P6[1] y sus antisueros al ser retados es de 2 a 10 veces, a pesar que estas cepas no comparten el mismo serotipo P.

En vista de estos resultados y a manera de ampliar un poco más el estudio sobre este punto, se tomaron los suero patrones positivos (INTA) los cuales provienen de cobayos inoculados con INDIANA y se les determino el título de AcN que presentaban para ambas cepas. El título obtenido para WC3 fue igual que el obtenido para la cepa INDIANA de la cual se originó. Aparentemente nuestros antisueros WC3 (sueros vacunales) son más sensibles a la cepa Homologa INDIANA, que los antisueros INDIANA en la situación contraria, es decir se presentó una relación antigénica de un solo sentido, teniendo el antisuero INDIANA una más amplia actividad neutralizante.

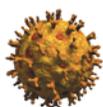


Tabla. 6. Títulos de Anticuerpos neutralizantes homólogos y heterólogos de sueros cobayos inmunizados con las 3 vacunas formuladas.

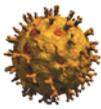
CEPAS	Título de AcN de antisuero WC3 por RFF		
	VMA	VMO	VPO
WC3	11469 ± 3010	26624 ± 6144	11923 ± 2159
INDIANA	717 ± 188 (16)	2048 ± 474 (13)	711 ± 126 (15)

CEPAS	Título de AcN de antisuero WC3 por DE ₅₀		
	VMA	VMO	VPO
WC3	3948 ± 751	8690 ± 1462	5227 ± 1210
B223	87 ± 24 (45)	181 ± 12 (48)	157 ± 12 (33)

Los valores entre paréntesis representan el número de veces mayor que fue el título en el ensayo con WC3 comparado con la cepa a estudio.

4.3.4.2 Cepa RBV B223

Con respecto a la comparación de los títulos de AcN en los sueros de cobayos con una cepa heteróloga como la cepa B223, la diferencia entre títulos de AcN fue hasta de 48 veces mayor. Esta medición se realizó solamente a través de DE₅₀. Estos resultados concuerdan a los obtenidos por Parreño y colaboradores 2009 [81] en estudios anteriores, donde no existe una reacción cruzada entre cepas heterólogas (G6 P[5] vs G10P[11]) en sueros de cobayos vacunados. Nuestros sueros



presentaron el patrón característico de seroneutralización, cuando son desafiados con una cepa de genotipo diferente a la cepa que les dio origen.

Por motivo de falta de tiempo no se pudo realizar RFF para estas valoraciones. A pesar de ser DE_{50} una técnica menos sensible, los resultados obtenidos por esta fueron homogéneo y consistente (a diferencia de lo ocurrido con INDIANA) lo que también ayudó a tomar los datos obtenidos como resultados definitivos.

4.3.5 Evaluación de la respuesta de Anticuerpos anti-RBV en bovinos vacunados.

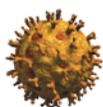
Como manejo preventivo contra el síndrome de diarreas neonatales en terneros se recomienda dos vacunaciones en el último tercio de la gestación [37, 38]. Debido a problemas en la coordinación de la realización de este ensayo en bovinos, ocurrió retrasos en las fechas de inmunizaciones de las hembras preñadas, solo pudiéndose lograr la vacunación entre los días 20 y 25 días antes del parto. No se realizó revacunación. Posterior a eso todo el ensayo se realizó con total normalidad. A medida que se iban recolectando las muestras se precedió a:

- La Medición de títulos de Ac IgG totales en muestras de: suero de las madres y terneros, muestras de calostros y leche de las madres y muestras de materia fecal en terneros, por la técnica de ELISA
- La Medición de Títulos de AcN para cepa WC3 y B223 en muestras de sueros de las madres y terneros por la técnica de DE_{50}
- Detección de antígeno RVB en muestras de materia fecal de ternero por la técnica de ELISA KERI.

4.3.5.1 Muestras de Calostro y Leche.

Como indica la Tabla 7, el análisis de las muestras de calostros a las 48 horas post nacimiento (PN), mostró que el promedio de los títulos de IgG totales anti-RVB en las hembras vacunadas (196608), fue 12 veces mayor al obtenido en las hembras controles (16384). No se pudo realizar un análisis estadístico debido al bajo número de animales por grupo.

Se pudo observar también diferencias a nivel de secreción de IgG en la leche. En las muestras tomadas en los días 7 15 y 21 post nacimiento (PN), el promedio de



títulos de IgG totales fue superior en las madres vacunadas con respecto al promedio de las madres no vacunada ver Tabla 7. Para el día 15 y 21 PN las hembras vacunadas presentaron un promedio de títulos de IgG de 1024 y 768 respectivamente, mientras el promedio del grupo control para estas dos fechas el cual fue 40 para ambos días. El título de Ac de las madres vacunadas fue superior para el día 15, 26 veces y para el día 21, 19 veces. En la Figura 19, podemos observar gráficamente como decae el título de Ac IgG anti-RVB en la leche durante el transcurso del tiempo PN.

Cabe mencionar que desafortunadamente no se pudo lograr organizar grupos homogéneo de vacas con respecto a la edad y el número de parto por poca disponibilidad de hembras preñadas para el ensayo. En el inicio del mismo se tomó como controles a dos animales que habían parido ese mismo día y sin dar oportunidad a realizar una mezcla de hembras jóvenes y hembras con mayor edad por grupo, manera de balancear el efecto de la edad y el número de parto que se ejerce sobre la cantidad y calidad del calostro producido [52, 53, 56].

El grupo control estuvo conformado por dos hembras adultas con 3 y 4 partos anteriores. El grupo vacunado estuvo conformado por 2 vaquillonas (1 parto) y una vaca adulta (3 partos anteriores). Este escenario pudiera estar en cierto modo aventajando al grupo control, a pesar de haber un número pequeño de animales por grupo.

Tabla7. Promedio de títulos IgG de bovinos anti-RVB en muestras de Calostro y Leche

Grupo Experimental	Títulos de IgG en Calostro	Títulos de IgG en leche		
		(7días PV)	(15 días PV)	(21 días PV)
Grupo Control	16384	ND	40	40
Grupo Vacunado	196608	3072	1024	768

ND no determinado

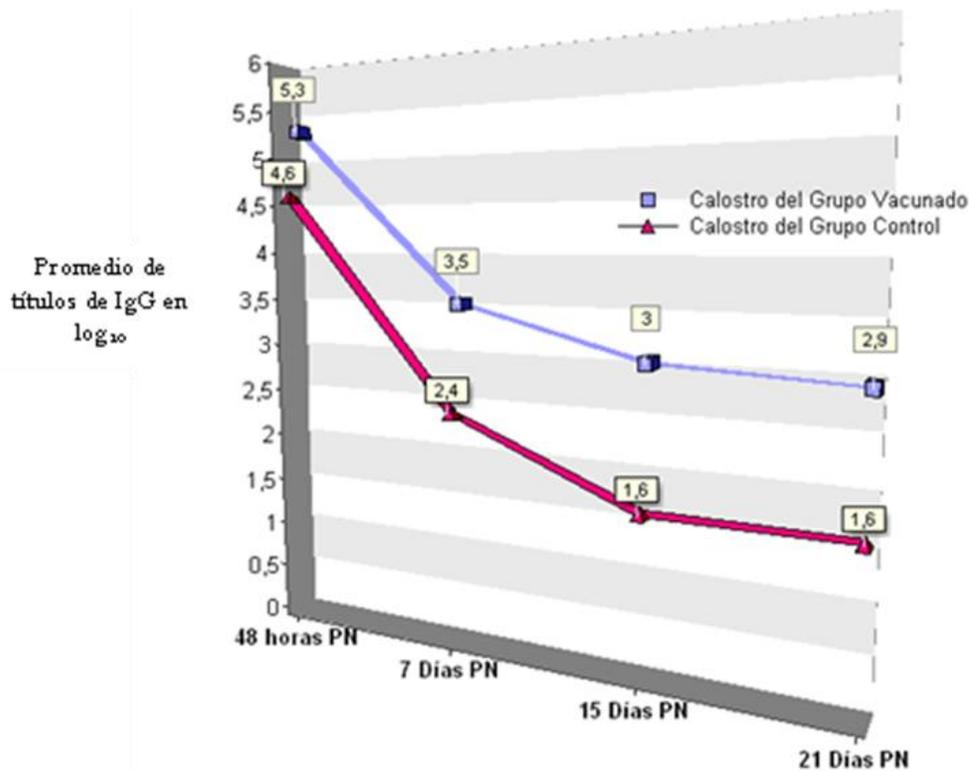


Figura 19. Comparación entre los promedio del log₁₀ de los títulos de IgG obtenidos en calostro y leche de los dos grupos experimentales. Los valores están expresados en log₁₀. Los valores para punto están indicados. Para el día 7 PN del grupo control se colocó un título de IgG de 250 el cual va acorde con el grado de disminución de los títulos observados para el grupo vacunado para ese momento, a manera de poder realizar la gráfica.

4.3.5.2 Suero de las Madres.

En las muestras de sueros de las madres vacunadas se observó un nivel de seroconversión de 18 veces mayor entre el título de IgG pre vacunación (PrV) y el título al día 45 post vacunación (PV). Determinando los promedios en base a log₁₀, de los títulos de IgG totales, al calcular la diferencia entre los dos obtenemos un valor de 1,4 en el nivel de seroconversión. Esto se compara con lo establecido por la sección de Virus Entéricos – INTA, donde a través de estudios previos, establecieron un valor de 0,75, como mínimo valor de log₁₀ de seroconversión que debe producirse en las hembras preñadas vacunadas entre los días 0 y 60 PV. Ante una vacuna que genere una seroconversión vacunal igual o por encima de este nivel, se puede decir que la potencia vacunal de ese lote es satisfactoria. (Dra. Parreño, comunicación personal). Como podemos observar nuestra vacuna dobla en valor del límite establecido. Tabla 8.



Tabla 8. Nivel de Seroconversión obtenido en las Hembras Madres Bovinas Vacunadas

Nº del Animal	Título de IgG totales PrV	Título de IgG totales PV
Madre 37	1024	65536
Madre 14	1024	16386
Madre 611	4096	65536
Promedio (\log_{10})	2048 (3,3)	49153 (4,7)
Diferencia entre días 0 y días 45 PV = 1,4		

Lamentablemente por los contratiempos ocurridos al inicio de este ensayo no fue posible obtener muestras homologas a las muestras PrV, en las madres no vacunadas. Por motivos de manejos de los animales, solo fue posible obtener muestras de sueros de las hembras no vacunadas para el día 45 PV donde se volvió a sangrar todas las hembras que constituyeron el ensayo. Los títulos de IgG que presentó este grupo para esa fecha de toma de muestra fue de 4096 para cada animal.

Si comparamos el promedio de los títulos de IgG al día 45 PV entre los dos grupos, el promedio del grupo de hembras vacunadas fue 12 veces superior al grupo control de hembras no vacunadas.

Al medir los títulos de AcN a través de DE_{50} podemos observar en los animales vacunados como va ascendiendo los títulos en los días posteriores a la vacunación y al comparar el día 45 PV con el suero PrV de este mismo grupo, vemos un aumento 8 veces. Al compararlos con el promedio de AcN de los animales controles para la misma fecha (día 45 PV), ocurrió un aumento de 7 veces. Tabla 9.

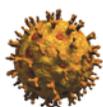


Tabla 9. Promedios de títulos AcN e IgG en suero de las Hembras Madres Bovinas

Grupo Experimental	Títulos de Anticuerpos					
	PrV		21 días PV*		45 días PV	
	AcN	IgG	AcN	IgG	AcN	IgG
Grupo Control	ND	ND	ND	ND	1183	4096
Grupo Vacunado	987	2048	4077	40961	7840	49153

Abreviaturas: ND no determinado. El signo * está indicando el momento del parto. Los títulos de AcN se determinaron por DE₅₀. Los títulos IgG se determinaron por ELISA.

Para el momento del parto y de la producción de calostro, el promedio de los títulos de IgG había aumentado 20 veces con respecto al promedio de los títulos de suero PrV. Determinando el promedio del log₁₀ de estos títulos, el aumento fue de 1,3, es decir ya para el momento de la producción del calostro, la vacunación había superado los niveles mínimos de potencia establecidos, a pesar de que la vacunación ocurrió tardíamente, dejando solo 21 días entre la inmunización y el parto, y no los 60 días que son recomendados para este proceso.

Con respecto a los anticuerpos AcN, la vacunación produjo un aumento de 4 veces entre el suero PrV y el suero obtenido al momento del parto.

4.3.5.3 Suero y Materia Fecal de los Terneros Nacidos.

Los resultados de estos análisis realizados en suero y materia fecal de terneros se resumen en la Tabla 10.

En los títulos de IgG de los sueros de ternero adquiridos vía inmunidad pasiva podemos observar la disminución característica de estos títulos en la primera



semana de vida del animal, tanto en los terneros hijos de madres vacunadas como los terneros hijo de las madres controles.

El nivel de títulos de IgG a las 48 horas es directamente proporcional a los títulos de IgG presente en calostro ingerido. Por ende los terneros hijos de las madres vacunadas (terneros 643, 644 y 386) demostraron tener mayores títulos de IgG a las 48 horas y a los 7 días PN, tanto en el suero como a nivel de excreción en materia fecal (MF).

Este grupo de terneros hijos de madres vacunadas (GV), tuvo una marcada disminución de entre 4 a 8 veces, de sus títulos de IgG, en la primera semana y en las dos semanas posteriores este título se mantuvo estable.

Con respecto al comportamiento de los AcN, estos valores fueron más plurales, a pesar de que no ocurrió un aumento marcado en ninguna de las muestras tomadas a través del tiempo, en algunos caso no hubo disminución de los títulos de AcN (ternero 643), en ninguno de los momentos y en otro si ocurrió una disminución considerable en las semanas posteriores.

Lo observado en el suero de los hijos de madres no vacunadas (terneros 136 y 641) (GC) fue diferente. Posterior a la disminución de los títulos de IgG en la primera semana de vida ocurrió un fenómeno de aumento esta inmunoglobulina. Para el día 21 PN, los títulos de IgG aumentaron entre 16 y 64 veces al compararlos con los títulos disminuidos del día 7 PN.

Con respecto al nivel de IgG en materia fecal de los terneros, en el día 15 PN los terneros GC presentan niveles bajos IgG (16), uno de ellos ya presentaba este título para el día 7 PN. Los terneros GV, para el día 15 PN presentaron un títulos de IgG 16 veces mayores que los terneros controles. Solo se detectó presencia de IgG en MF hasta el día 15 PN en todos los animales, independientemente del grupo experimental.

En otro aspecto, ocurrió detección de Ag de RVD por ELISA, en las muestras de MF de los terneros del grupo control, a los días 7 y 15 PN en cada ternero, concordando con la disminución de títulos de IgG en MF que presentaron estos animales.

Si analizamos todo el contexto podemos observar para el día 7 el ternero número 641 presenta en MF un nivel bajo de títulos de IgG al compararlos con el resto de los terneros ya sea de madre vacunadas o del grupo control. En esa muestra de MF la cual poseía un aspecto diarreico, que podría catalogarse de nivel 2 según la clasificación hecha por Parreño, y colaboradores 2010 [84], (0, normal; 1, pastosa;



2, semilíquida; 3, líquida) también se detecta presencia de Ag de RVB, por lo que se deduce que animal se encontraba susceptible a la infección por RVB al no poseer un nivel apropiado de protección a nivel intestinal. Es posible que la disminución de los títulos de IgG en MF, también deberse al consumo de los mismos a nivel intestinal en un esfuerzo por neutralizar y detener la infección por Rotavirus [58].

La detección de los Ag RVB concuerda con el aumento de IgG a nivel sérico que presento este ternero una semana después de la detección, para el día 15PN.

El mismo escenario se presentó para el ternero 136 del GC, donde para la MF del días 15 PN, presento características de diarrea (clasificación 2 [84]) (figura 21), ausencia de IgG y detección de Ag RVB en la misma. También se observó aumento de IgG en suero para el día 21 PV en este ternero.

Se puede establecer que el fenómeno observado de aumento de los títulos de IgG en los terneros GC, se debió que los animales entraron en contacto con el virus a nivel de campo y de manera natural.

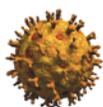


Tabla 10. Comportamiento de las inmunoglobulinas en muestras de suero y heces de terneros

Grupo Experimental	Títulos de Anticuerpos en las Muestras											
	48 Horas PN			7 Días PN			15 Días PN			21 Días PN		
	AcN	IgG S	IgG MF	AcN	IgG S	IgG MF	AcN	IgG S	IgG MF	AcN	IgG S	IgG MF
GC Ternero 136	1024	4096	1024	511	1024	256	<u>2572</u>	<u>4096</u>	16 Ω	<u>4096</u>	<u>16384</u>	NEG
GC Ternero 641	1024	4096	256	134	256	16 Ω	<u>4096</u>	<u>16384</u>	16	<u>6492</u>	<u>16384</u>	NEG
GV Ternero 643	6492	65536	4096	511	4096	4096	643	4096	256	511	4096	NEG
GV Ternero 644	2043	16384	4096	2043	4096	1024	2043	4096	256	2572	4096	NEG
GV Ternero 386	ND	ND	ND	2043	16384	1024	511	1024	256	257	1024	NEG

ABREVIATURAS. GC: grupo control, GV: grupo vacunado, IgG S títulos de IgG en suero, IgG MF títulos de IgG en Materia Fecal, Signo de Ω indica detención de Ag de RVB, AcN título de AcN determinado a través de DE50
Títulos Subrayados indican aumento de los títulos IgG debido a posiblemente por contacto con RVB

En un análisis más detallado de MF, podemos observar que para las 48 horas PN existe altos niveles de excreción de IgG vía intestinal y que estos niveles son proporcionales a los títulos de IgG presente en el calostro ingerido por cada animal y al nivel de IgG séricas en terneros adquiridas por inmunidad pasiva. En la Figura 20, se observa la relación que existe entre el nivel de IgG ingerido a través del calostro o de la leche y la excreción de IgG en las heces. También se observa cómo se relaciona la presencia de bajos niveles de IgG con la detección de Ag rotavirales en heces.

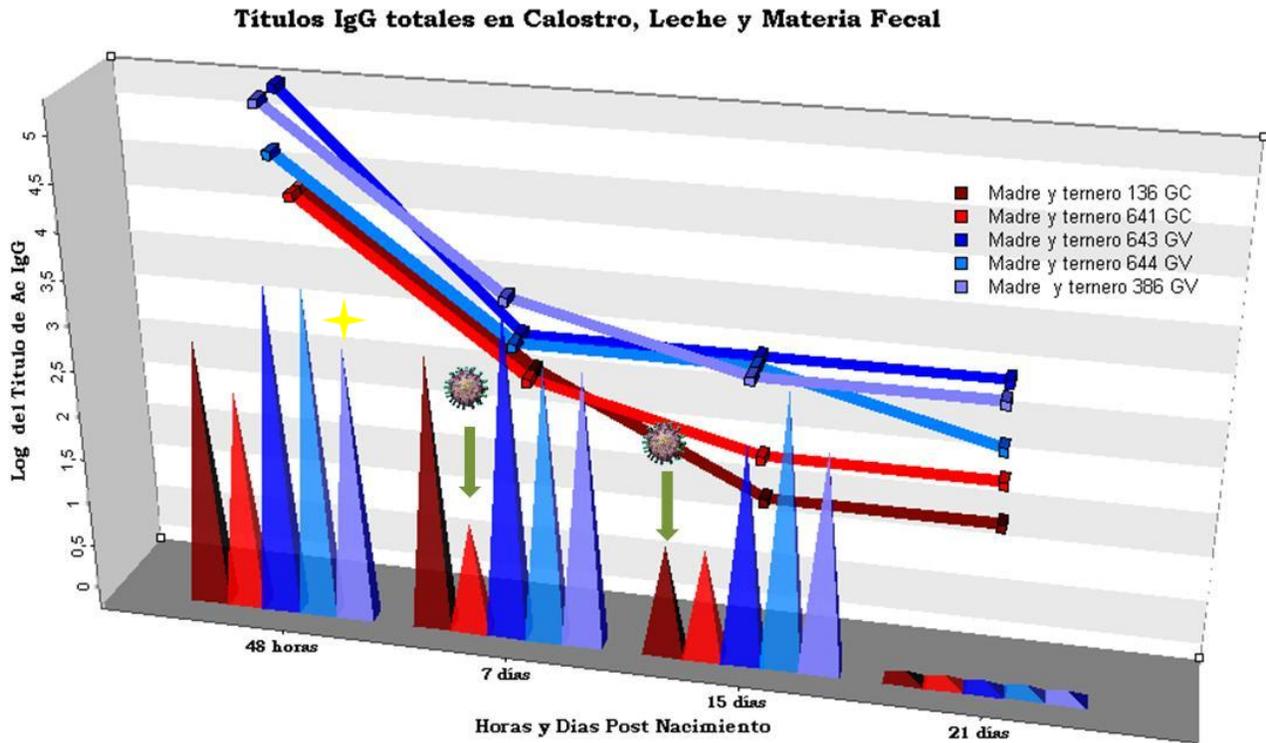
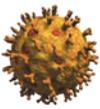


Figura 20. Comparación entre los niveles de IgG ingeridos en el calostro y leche y los niveles de IgG excretado en heces. La flechas verdes indican en que muestras de MF hubo detección de antígeno rotaviral. La estrella está indicando que en el caso del ternero 386 a las 48 horas, donde no se pudo determinar los títulos de IgG en MF, se colocó el mismo valor que presentó la MF para el días 7 PN, a modo de ser menos confuso el gráfico.

Un hecho curioso es que no se detectó presencia de IgG en ninguna muestra de heces al día 21 PN, principalmente en los terneros GV, los cuales para esa fecha estarían consumiendo leche con títulos de IgG de entre 1024 y 256. Esto puede deberse a una disminución en la atención de las tareas involucradas en el desarrollo del experimento por parte de los cuidadores de los animales para finales del ensayo, donde es posible que los terneros no se estuviera alimentando con la leche de su propia madre, si no que en su lugar se alimentaran, con una mezcla de leche realizada a partir de todos los ordeños.

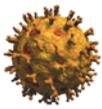


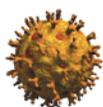
Figura 21. Foto que muestra a ternero N° 136 GC, con signo de diarrea al día 15 PN, los cuales se pueden observar en la región posterior del animal.

4.3.5.4 Protección Heteróloga en Bovinos

Todos los sueros obtenidos en el ensayo de inmunización de esta especie fueron retados a través de la prueba de seroneutralización DE_{50} con la cepa B223, con el fin de medir la magnitud de la protección cruzada que se generó en las madres vacunadas frente a una cepa de RVB heterólogas.

Los resultados obtenidos en nuestros sueros bovinos se pueden analizar en la Tabla 11. Si comenzamos el análisis por el suero PrV de las madres vacunadas observamos una diferencia de 8 veces mayor del título de AcN para WC3 con respecto al del B223.

Al momento del parto se observa un aumento de los títulos de AcN para ambas cepas. La diferencia para la cepa WC3 es de 4 veces y para los títulos de B223 en PrV y al momento del parto, es de 8 veces. Esto indica una respuesta hacia la cepa heteróloga en la hembra vacunada a pesar de solo contener la vacuna antígeno de WC3.



Para el día 45 PV disminuyó aún más esta distancia entre los títulos de AcN de WC3 y B223, siendo de 3 veces. Para esta fecha el título para B223, aumentó 20 veces con respecto al título que presento en PrV. Para ese mismo momento las madres no vacunadas a pesar de presentar títulos más bajos para estas dos cepas, la diferencia entre ellos es de 3 veces, si tomamos en cuenta que estos animales nunca han sido vacunados contra ninguna cepa de RVB, la diferencia entre estos dos títulos es mucho menor a la observada en los sueros PrV de las madres vacunadas (8 veces) Una posible explicación para este fenómeno, es la mayor edad y número de parto que posee el grupo control con respecto al grupo de los vacunados.

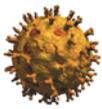
Si comparamos los títulos de anticuerpos para la cepa B223 entre el grupo vacunados y no vacunados podemos observar un aumento de 7 veces en el grupo de vacunados a los 45 PV. El mismo aumento se da para los títulos AcN de cepa WC3 al comparar las hembras vacunadas con las no vacunadas.

Tabla 11. Promedios de AcN obtenidos en sueros bovinos (madres y terneros) frente a una cepa homologa (cepa vacunal) y heteróloga.

Grupo Experimental	Títulos de Anticuerpos AcN														
	Madres Bovinas (PV)						Terneros (PN)								
	PrV		21 días PV*		45 días PV		48 horas		7 Días		15 Días		21 Días		
WC3	B223	WC3	B223	WC3	B223	WC3	B223	WC3	B223	WC3	B223	WC3	B223	WC3	B223
Grupo Control	ND	ND	ND	ND	1183	383	1024	331	319	128	3334	458	5294	331	
Grupo Vacunado	987	128	4077	1024	7840	2572	4267	1022	1532	853	1066	426	1113	298	

ABREVIATURAS: ND no determinado. AcN: Anticuerpos Neutralizantes, PrV: Pre vacunación, PV: Post vacunación, PN: Post Nacimiento. El signo * está indicando el momento del parto.

Al analizar el comportamiento de los AcN tanto para la cepa WC3 como para B223 en los terneros, se observó para las 48 PN, una adquisición de un nivel de AcN acorde con los títulos medidos para el momento del parto, en el grupo de las madres vacunadas. Por otro lado, asumiendo que las no vacunadas poseían el mismo título de AcN en el parto, que a los 45 días PV la adquisición de AcN vía pasiva en estos terneros controles para estas dos cepas, fue acorde con los títulos



de AcN presentado en las madres. También se mantiene la misma relación de diferencia entre los títulos de AcN para las dos cepas que poseía la madre para el momento del parto. En el grupo de terneros GV, los títulos para ambas cepas van disminuyendo en las primeras semanas de vida, ya para el día 21 PN ocurrió disminución de 3 veces al compararlos con el título obtenido a las 48 horas.

El panorama es muy diferente para los terneros GC. Para las 48 PN presentan niveles de AcN muy similares a los del suero de sus madres a los 45 días PV. Para el día 7 PN, se observa cierta disminución de los títulos, pero ya para el día 15 PN ocurre un aumento, inclusive por encima de los presentados a las 48 horas, principalmente para los títulos de AcN para la WC3. Este punto coincide con la detección de Ag rotavirales en las muestras de MF a partir del día 7 PN y con el aumento de las IgG totales séricas para los días 15 y 21PN, ocurridas en este grupo control, que explicamos anteriormente.

Por ende, el contacto con la cepa de campo influyó también con el aumento de los títulos de anticuerpos neutralizantes como era de esperarse. Este aumento sigue avanzando en los días 15 y 21PN para la cepa WC3, a diferencia para la cepa B223 los títulos AcN aumentan pero no al mismo nivel que para la WC3 e inclusive para el día 21 PN, disminuyen un poco. Por lo que para estos días la diferencia de los títulos AcN entre estas dos cepas se hace mayor que la observada a las 48 horas y 7 días de nacidos.

En conjunto esto podría estar indicando que el posible genotipo de la cepa de campo con la cual los animales entraron en contacto podría estar relacionada serológicamente con la cepa vacunal WC3 y no con la cepa B223.

A pesar que se generó cierto nivel de protección para una cepa heteróloga, este siempre fue menor al obtenido para la cepa vacunal, aunque no se pudo comprobar si existieron diferencias significativas entre estos resultados.



5. DISCUSIÓN



5.1 PROCESO DE PRODUCCIÓN DE LA VACUNA

Partiendo de la base donde la producción uniforme de vacunas de gran calidad, inocuas, potentes y eficaces requiere procedimientos de control de calidad, a lo largo de todo el proceso de producción, podemos decir, en términos generales, que se obtuvo un resultado satisfactorio en la producción de la vacuna inactivada contra el RVB, con la utilización de la cepa de RVB WC3.

Como primera estrategia para poder alcanzar esta meta, se procedió a conocer todas las características de multiplicación y rendimiento viral que poseía esta cepa, en la línea celular MA104, de manera de poder diseñar el mejor protocolo de manejo, con el fin, de obtener los mejores resultados en cuanto a la producción de antígeno Viral.

La producción de antígenos virales de calidad, es de suma importancia, ya que estos implican iniciar la producción de la vacuna con pronóstico favorable. Sin quitar importancia a los procesos de inactivación y formulación, el contar con antígenos de calidad al inicio del proceso de producción, nos garantiza un alto porcentaje de éxitos en el desempeño que tendrá el producto en cuanto a eficacia y eficiencia vacunal al momento de ser utilizado.

Pudimos observar en los ensayos de multiplicación viral, una vez diseñado el protocolo apropiado, un alto rendimiento en la producción de suspensiones virales con títulos iguales o superiores de 10^7 DITC₅₀/mL, con un buen nivel de reproducibilidad y de manera rápida. Y decimos rápida ya que, a pesar de que el tiempo de óptimo de cosecha de estas suspensiones virales fue al 5to día PI con valores de M.O.I. bajos en cultivos estáticos, (figura 6) este tiempo se redujo, entre 2 a 3 días PI cuando se realizó la producción de antígenos virales a mayor escala en sistema *Roller*.

Estudios anteriores, [43, 81, 58, 100 y conversación personal con Dra. Viviana Parreño, datos no publicados] han determinado que para que las vacunas inactivadas contra RVB generen un buen nivel de protección tanto en las vacas preñadas como en los terneros neonatos, están deben poseer suspensiones virales previa al proceso de inactivación con títulos iguales o superiores a 10^7 (UFF, UFP)/mL. La mayoría de las suspensiones virales generadas ya sea por cultivo estacionario o cultivo sistema *Roller*, presentaron este título viral, como mencionamos anteriormente. Esto concuerda con lo que establece Michelle Arnold y colaboradores, 2009 [75], donde menciona que las cepas rotavirales de animales usadas en los laboratorios crecen muy bien en líneas celulares continuas, llegando



a producir de 10^7 a 10^8 UFP/mL. No es el mismo escenario con cepas rotavirales humanas, donde pueden llegar a producir promedios de títulos virales de 2 a 3 log por debajo de estos valores.

Ahora sabiendo que nuestra técnica de titulación viral por dosis infectiva 50 % (DITC₅₀), fue original y desarrollada para la realización de este proyecto de tesis, nos vimos en la necesidad de corroborar su precisión en la medición de títulos virales. Al comparar los títulos obtenidos por DITC₅₀ con los obtenidos por Unidades Formadora de Focos (UFF), pudimos observar una alta correlación entre estos dos valores, a pesar que los valores de DITC₅₀ fueron un poco más altos que los obtenidos por UFF. La diferencia entre estos no fue mayor a 0,2 - 0,3 log₁₀, lo que en realidad no genera un alto nivel de sobreestimación de los títulos virales por DITC₅₀. Figura 7.

Esto es importante determinarlo, porque fue a través de DITC₅₀ que se realizó la titulación de las suspensiones virales que fueron inactivadas para generar las antígenos vacunales. En el supuesto caso que se hubiese sobreestimado los títulos virales y que las suspensiones virales inactivadas contaran con títulos virales menores a 10^7 DITC₅₀/mL, es muy probable que se hubiera visto afectada la potencia vacunal, lo cual no ocurrió. Por otro lado la suspensiones virales a inactivar tuvieron títulos virales superiores a 10^7 DITC₅₀/mL ($10^{7,4}$ DITC₅₀/0,5 mL, se coloca 0,5 mL por formulación) lo que pudo fácilmente amortiguar la falta de eso 0,2 - ,03 log₁₀, que se pudo haber sobreestimado, lográndose así, poder llegar a la concentración 10^7 DITC₅₀/mL necesaria para generar los antígenos vacunales.

El conjunto de todos estos hechos, es importante tomarlos en cuenta en las futuras generación de vacunas inactivadas contra RVB.

Al comparar el comportamiento en cuanto a multiplicación viral, y otros aspectos de la cepa WC3, con las otras cepas de RVB, podemos decir que esta se encuentra en un nivel intermedio entre las características que presentan la cepa INDIANA y la cepa B223. La cepa INDIANA tuvo un comportamiento más agresivo y más rápido a la hora de generar efecto citopático en las células MA104, generó mayores títulos virales por cada pasaje y presentó mayor resistencia a los proceso de congelación y descongelación que las suspensiones virales pudiesen haber sufrido durante la realización de los diferentes ensayos. Tabla 3

Por otro lado, a pesar que no trabajo con la cepa B223 por periodos prolongados como en el casos de las otras dos cepas, se pudo observar que la B223 presentó mayor dificultad al momento de la replicación viral y en la generación de efecto



citopático. Además el aumento de títulos virales por pase fue menor al observado con Indiana y WC3. La cepa WC3 tuvo un comportamiento intermedio con respecto al nivel de agresividad, aumento de títulos virales por pase y resistencia al proceso de descongelación. Tabla 3

Un hecho curioso que vale la pena mencionar fue que aunque se observó menor nivel de replicación viral y en la generación de efecto citopático, en la cepa B223, este comportamiento no fue tan marcado como se esperaba. Anteriormente se ha reportado [35] para la B223 y otras cepas relacionadas, dificultad para crecer y generar altos títulos virales en células MA104.

El control de la calidad de las vacunas siempre se ha basado en tres componentes: el control de las materias primas, el control del proceso de producción y el control del producto final [126]. Todas las materias primas utilizadas en la producción vacunal fueron homogéneas y debidamente caracterizadas de origen definido y calidad aceptable (inclusive las simientes de la línea celular y de la cepa viral ya que ambos fueron adquiridos a través de ATCC). Principalmente en aquellas de origen bovino como Suero Fetal Bovino y Tripsina Bovina, se utilizó producto de marcas mundialmente reconocidas (SIGMA, Gibco) que garantizan un producto libre de agentes adventicios como bacterias, hongos, micoplasma u otros agentes virales que puedan afectar a estas especies. Aparte también se les realizó controles de esterilidad propios.

Por otra parte la creación de bancos de células bien caracterizados y de calidad controlada, mejoraron el nivel de seguridad con el que se produjo la vacuna. La creación de crioviales con alícuotas homogéneas tanto del Banco Maestro como el Banco de Trabajo de células, permitieron una mayor reproducibilidad de los trabajos fabricación del producto, disminuyendo el riesgo de variabilidad del sustrato biológico entre las etapas de producción y proporcionando una fuente constante de material de partida homogéneo y libre de contaminantes adventicios, lo que garantiza para el futuro en una producción uniforme de lotes de vacunas. Además los Bancos de Trabajo de células, proporcionan sustrato biológico caracterizado y controlado para la elaboración de ensayos biológicos que participan en la evaluación de potencia de la vacuna, eficacia de la vacuna, toxicología y detección de agentes adventicios en subproductos o en la formulación final.

Los mismos beneficios son recibidos con la generación del Banco Maestro y Banco de Trabajo de semilla viral, elaborando crioviales con alícuotas homogéneas para la cepa WC3, asegurando la uniformidad de la misma y evitando riesgo de contaminación en la producción de la vacuna.



Otras de las acciones tomadas para garantizar la calidad de la producción fue la caracterización de la cepa vacunal a través del método molecular RT-PCR *Heminested Multiplex*. Este se realizó a nivel del pase que daría origen al Banco Maestro de semilla viral, de manera de elaborar este control en la etapa más temprana posible de multiplicación viral. Se obtuvo un resultado satisfactorio, comprobándose que nuestra cepa WC3 poseía el genotipo indicado para ella (G6 P[5]) y que no presentaba posible contaminación con otras cepas Rotavirales de genotipos distintos.

En el resto de los controles de seguridad realizados en las distintas etapas de la producción (pruebas de esterilidad, detección de micoplasma, control fenotípico y genotípico de la línea celular y de la cepa viral, control de inocuidad del antígeno inactivado) se obtuvo resultados satisfactorios. En general podemos resumir que la producción de la vacuna, se realizó, en óptimas condiciones y con un alto nivel de efectividad en los controles de seguridad. Además se contó con el asesoramiento de personal altamente calificado, tanto en las buenas prácticas de laboratorio, como en la realización de pruebas de control, lo cual minimiza los riesgos de contaminación y garantiza la obtención de resultados confiables.

El hecho que en el Laboratorio Santa Elena tenga implementado todas estas pruebas de control de calidad, como trabajo rutinario, logró que la producción de esta nueva vacuna contra el RVB, fuese un proceso rápido, eficiente y sin contratiempo alguno. Ha esto se sumó el uso de protocolos óptimos de fabricación de vacunas y el uso de materia prima no biológica de alta calidad.

Con respecto a las formulaciones, cada tipo de vacuna generada se le colocó, el volumen de antígeno adecuado que proporcionara como mínimo una concentración viral antes de ser inactivada, de 10^7 DITC₅₀ /mL por dosis aplicada. Es importante mencionar, que debido a los altos títulos virales que presentaron las suspensiones virales a inactivar, se pudo generar una dosis vacunal de volumen bajo (3 mL) sin necesidad de tener que someter a los antígenos viral por procesos de concentración y de purificación. Tabla 4.

Normalmente estos procesos se realizan al elaborar vacunas inactivadas, principalmente para evitar tener que administrar cantidades relativamente grandes de preparados de virus no purificados para proporcionar antígeno suficiente, los cuales contienen mucho material de las células huésped, lo que pudiese provocar efectos colaterales indeseables[127]. Nuestros 3 mL de dosis poseen en conjunto, el adyuvante, el antígeno viral y diluyente, lo que nos indica la buena calidad del antígeno inactivado, ya que con volúmenes de entre 0.25 mL a 0.5 mL se aportaba



la cantidad suficiente de masa antigénica vacunal. La dificultad se presentó al formular la vacuna polivalente oleosa, la cual poseyó antígeno para WC3 y otros virus lo que redujo la capacidad del volumen para este antígeno. Aun con los 0,25 mL colocados en la formulación se colocó la cantidad necesaria de masa antigénica vacunal para generar una respuesta inmune adecuada. Tabla 4.

Una ventaja de diseñar dosis con volumen bajos se obtiene al disminuir los efectos adversos que pueden generar las vacunas oleosas en los animales vacunados. A menor volumen de inoculación, menor es el riesgo de desarrollar inflamación crónica, ulceración de la piel, absceso local o desprendimiento de tejidos. El uso de volúmenes más pequeños en cada lugar de la inyección han sido uno de los manejos eficaces en la eliminación de las complicaciones post-vacunación.

5.2 ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS

Cuando nos referimos a la validación de una técnica, lo que se trata es de demostrar pruebas reales de que el sistema cumple lo previsto. Por ende, se optimizan los reactivos y protocolos para detectar la sustancia analizable, (antígenos de RVB y anticuerpos IgG anti – RVB), con exactitud y precisión, garantizando la repetibilidad y reproductibilidad del ensayo. Esto es de suma importancia ya que a partir de la validación de un método, se toman por confiables y válidos todos los resultados obtenidos a través de este. Cuando se trata de un método que es utilizado en la medición de la calidad de las vacunas, estos resultados sirven para conocer y comprender de una situación dada, por lo que se analiza si todo va acorde a lo esperado o si por el contrario, hace falta realizar algunas acciones o ajustes en los próximos pasos

Detección del antígeno rotaviral

La principal ELISA utilizada para la detección de antígeno de Rotavirus en muestras de suspensión viral, suspensiones vacunales y muestras de heces bovina fue el ELISA KERI, la cual fue reproducida siguiendo estrictamente el protocolo de elaboración y reactivos biológicos suministrado por la sección de Virus Entéricos del Instituto de Virología del INTA.

La técnica de ELISA para la detección de antígeno de Rotavirus implementada en esta tesis, fue desarrollada con el fin de dejar puesto a punto el método, bajo las características y requerimientos particulares del laboratorio Santa Elena, de manera



que para la elaboración de futuros lotes de esta vacuna cuente con la técnica ya estandarizada e implementada. Como ya hemos mencionado anteriormente esta se derivó del ELISA KERI y utilizo esta última como referencia para la validación de sus resultados. Como podemos observar en los resultados, al comparar los datos obtenidos con estos dos métodos, vemos como la ELISA para la detección de antígeno de Rotavirus implementada en esta tesis, posee en sus valores de densidad óptica un menor nivel de inespecificidad a compuestos de las muestras analizadas que puedan servir de interferencia. Esta técnica es un poco más sensible que la ELISA KERI, si quitarle meritos a esta última. Esta mayor sensibilidad se puede observar principalmente en las muestras débilmente positivas, donde se obtienen valores de D_{0c} por encima y más distantes al punto de corte. Figura 11.

Proponemos que esto pudo deberse a la utilización de anticuerpos policlonales adquiridos comercialmente, para la etapa de sensibilización de la placa. Estos poseen un mayor nivel de purificación, lo que evita que otros componentes de los sueros donde fueron obtenidos, reaccionen inespecíficamente con sustancias potencialmente interferentes que puedan estar presentes en las muestras. A diferencia de esto, en ELISA KERI para esta etapa, utiliza suero completo de cobayo hiperinmune a RVB, como captura positiva, y como captura negativa utiliza suero de cobayo completo negativo a RVB.

Otra diferencia radica en la utilización de un policlonal anti RVB ya conjugado, en el ELISA implementada para la tesis. La ELISA KERI, utilizan un sistema de detección indirecto donde colocan como anticuerpo secundario IgG semipurificada, obtenidas a partir de sueros de bovino hiperinmune a RVB. Posteriormente colocan el anticuerpo conjugado anti IgG bovinas. Este sistema tiene una mayor sensibilidad en la detección, por presentar una amplificación de señal debida a la unión de dos o más anticuerpos conjugados por cada secundario, en comparación a cuando se utiliza un solo anticuerpo secundario conjugado.

A pesar de este punto, la ELISA implementada para la tesis, presenta un leve aumento en la sensibilidad. Es posible que no exista una mayor diferencia en el nivel de sensibilidad entre estas dos técnicas, debido a que cada uno de los puntos expuesto anteriormente puede contrarrestarse en sus efectos.

Se puede proponer para aquellos casos de diagnóstico donde una muestra analizada arroja un resultado confuso entre ser negativa o débilmente positiva, una opción de realizar una ELISA donde se utilicen para la sensibilización de la placa, policlonales de alta calidad adquiridos comercialmente y donde se utilice un sistema de detención indirecto. Con estas dos aplicaciones, seguro habrá aumento de la



sensibilidad de la prueba y capaz se logre una mejor determinación de la condición real de la muestra problema.

Es importante mencionar, a pesar de haber obtenido resultados consistentes con cada una de las muestras patrones, en la ELISA implementada para la tesis, estos resultados podrían tomarse solo como preliminares debido al bajo número de repeticiones realizadas. Debe repetirse el ensayo un mayor número de veces y probarse con otras muestras identificadas previamente por ELISA KERI, para poder dar una alta credibilidad a este ensayo.

Evaluación de la masa antigénica vacunal

El diseño del ensayo para la evaluación de la masa antigénica vacunal fue propio del proyecto de tesis. Al comparar la masa antigénica vacunal adsorbida por el adyuvante, con una suspensión de título viral semejante al de la suspensión viral que dio origen a los antígenos vacúnales, se trató de determinar si el proceso de inactivación viral y de formulación de la vacuna afectaba la capacidad antigénica de las proteínas virales para ser reconocida por la prueba de ELISA y de generar una respuesta inmune adecuada en el animal vacunado. Figura 10.

De haber una disminución en la medición de masa antigénica vacunal a través de esta técnica podría deberse a:

- Degradación de los epítopes antigénicos de las proteínas virales durante el proceso de inactivación, disminuyendo la capacidad antigénica de la vacuna. Este era uno de los principales problemas que ocurre cuando se realiza el proceso de inactivación usando formaldehído [61, 143, 144].
- El proceso de adyuvado no ocurrió adecuadamente, existe poca cantidad de antígeno adyuvado. Este factor también disminuye la capacidad inmunogénica de la vacuna. Si este fuese el caso, deberá detectarse antígeno rotavirales en el sobrenadante de la vacuna al ser analizado por ELISA.

Como se mencionó en el capítulo de Resultados, esta prueba resultó satisfactoria. Se detectó iguales concentraciones de antígenos rotavirales, en la suspensión viral y en la masa antigénica vacunal adyuvada.

Este es otro indicio que se ejecutó una labor eficiente y de alta calidad en los procesos de inactivación y formulación de las vacunas. Al menos se pudo comprobar de forma experimental para el caso de la vacuna monovalente Acuosa.



Estos resultados poseen un cierto grado de extrapolación hacia las vacunas oleosas, ya que estas, contienen el mismo antígeno inactivado, aunque el adyuvante y el proceso de formulación son diferentes al adyuvado con hidróxido de aluminio.

Si existió alguna falla en la concentración o alguna alteración de la reactividad de la masa antigénica en estas vacunas oleosas, a pesar de no haberse ejecutado este ensayo sobre las mismas, esta falla repercutiría en la respuesta inmunológica de los cobayos al ser inmunizado con estas vacunas. Es el mismo caso si hubiese disminución a la reactividad antigénica a nivel de alteración y reconocimiento de epítopes u otros, que afectase la generación de respuesta humoral contra cualquiera de las tres vacunas generadas, esto se detectaría a través de la prueba de potencia en cobayos.

Por ende, la medición de la masa antigénica, es un adicional que se realiza al control de inmunogenicidad de los lotes de vacunas. En estos dos ensayos radica la capacidad de realizar una buena y acertada medición de potencia en vacunas contra el RVB.

Pruebas de Seroneutralización

Al igual que en el caso de la titulación viral por $DITC_{50}$, la seroneutralización (SN) por dosis efectiva 50 (DE_{50}) también es original y fue desarrollada para este proyecto de tesis. Por ello nos vimos en la necesidad de validar la presión de nuestros resultados a través de otra técnica, como fue en este caso la técnica de Reducción de Focos Fluorescentes (RFF). Durante esta comparación de los sueros de cobayos al día 60 PI, pudimos observar una mayor sensibilidad y especificidad por parte de la RFF, con medición de títulos de anticuerpos neutralizantes (AcN) de hasta 4 veces mayores a los detectado por DE_{50} . Figura 12.

Cabe mencionar que los Ensayo DE_{50} , suelen medir el nivel de protección que puede ofrecer un suero a través de estrictos criterios de presencia o ausencia de efecto citopático. También son menos eficaces para proporcionar mediciones más cuantitativas del nivel de anticuerpos, tales como la concentración de suero que pueden inhibir el 70 o 90% de la infección [128]. La determinación del nivel de protección en los pocillos puede llegar a ser difícil, ya que se basa principalmente en la morfología que presentan las células, por lo que las interpretaciones pueden llegar a ser subjetivas. Este problema puede ser más grave cuando diferentes investigadores están involucrados en la interpretación. Muchas de estas desventajas del método DE_{50} son reducidas al aplicar metodologías más



cuantitativas y más exactas como SN por reducción de unidades formadoras de placas o por RFF.

Para nuestro caso, para la prueba DE_{50} , solo se consideraba el pocillo que neutralizó al virus cuando el mismo no presentaba ningún efecto citopático, lo que conlleva a no contabilizar aquellos pocillos que neutralizaron medianamente al virus, por lo que se generó a una mayor exigencia al momento de calcular el título de anticuerpo por Reed y Muench [87]. Se decidió optar por este criterio de medición, como una manera de realizar lecturas más acertadas y disminuir la subjetividad que podía ocurrir al momento de leer la prueba.

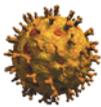
La sensibilidad de esta prueba se vio más afectada para aquellos casos, donde el suero problema presentaba altos títulos de AcN. Fue allí donde se observó la mayor diferencia entre los títulos de AcN calculados por ambas pruebas, para un mismo suero.

En general para los distintos grupos de cobayos vacunados, el promedio de títulos de AcN obtenidos por DE_{50} , fueron menores que los obtenidos por RFF. Esto es importante mantenerlo en cuenta para futuras mediciones de potencia vacunal de los nuevos lotes de vacunas a producir, en caso de seguir utilizando este método. Figura 12.

Una acción que puede aplicarse para aumentar la sensibilidad del método DE_{50} podría enfocarse en disminuir lo estricto del criterio de lectura de la prueba. Esto se basaría en tomar como no protegido solo aquellos pocillos que presenten intenso efecto citopático generalizado, con desprendimiento total de la monocapa. En casos de que algún pocillo presente cierto grado de efecto citopático, pero no tan intenso como el caso anterior, a los 5 días PI, (día final de lectura), podría tomarse el mismo como protegido, al momento de calcular el título de anticuerpo.

En todo caso, a la hora de medir potencial vacunal a través de producción de títulos de AcN en animales vacunados, si los títulos son un poco subestimados, esta situación no es tan relevante, siempre y cuando el resultado de la prueba de potencia no sea insatisfactorio por este hecho. Situación crítica sería si ocurriese lo contrario, haya una sobreestimación de los títulos de AcN, y la prueba de potencia termine siendo satisfactoria cuando en realidad no es así.

Para las vacunas inactivadas contra RVB, la prueba de potencia está principalmente regida por los resultados obtenidos a través del ELISA para la detección de anticuerpos del isotipo IgG en suero de cobayos. Las pruebas de seroneutralización son un complemento en la medición de la potencia, que ayudan a conocer mejor el



panorama de protección generado en los animales vacunados. Solo con el análisis en conjunto de estos dos los resultados, se puede determinar con certeza si la prueba de potencia de un lote vacuna fue satisfactoria o no [136].

5.3 MEDICIÓN DE RESPUESTA SEROLÓGICA EN COBAYOS INMUNIZADOS

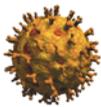
Respuesta de los IgG totales

Este ensayo de inmunización se realizó en todas sus etapas, bajos los criterios del bienestar animal, siguiendo en la medida de lo posible, la aplicación de procedimientos bioéticos para reemplazar, reducir y refinar el ensayo con animales (la regla de las tres R).

Todos los cobayos vacunados, independiente de la formulación, desarrollaron una óptima respuesta inmune.

Como se mencionó en el capítulo de resultados la medición de los títulos de IgG totales en los sueros de cobayos vacunados, se realizó a través del ELISA protocolo puesto a punto para la tesis. Al analizar el comportamiento de la respuesta de IgG ante el proceso de vacunación, lo primero que podemos mencionar es el efecto que ejerce del tipo de adyuvante a esta respuesta.

Inicialmente se consideró que los adyuvantes tipos acuosos tenían un efecto “depot” y que retardaban la eliminación del antígeno del punto de inoculación. Sin embargo, posteriormente, se comprobó que estos adyuvantes incrementan la inmunogenicidad a través de otros mecanismos: activando las células presentadoras de antígeno, induciendo la producción de citoquinas, de complemento [129]. Esto puede ser observado en los altos títulos de IgG que presento el grupo de cobayos inmunizados con la vacuna monovalente acuosa (VMA), para el día 30 post vacunación (PV). Para esa fecha fue el grupo con el promedio más alto de IgG. El hecho de que los grupos de cobayos inmunizados con las vacunas con adyuvantes oleosos, hayan tenido menores promedios de IgG para ese momento, puede atribuirse al modo de acción de este tipo de adyuvante, donde la liberación y degradación del antígeno más lenta al localizarlo en el sitio de inoculación, lo que induce una reacción inflamatoria que a su vez promueve su retención [63]. Figura 14.



Este escenario es totalmente distinto para el día 60 PV. Para este momento el grupo con mayor promedio de IgG es el grupo inmunizado con la vacuna monovalente oleosa (VMO). Este presentó una seroconversión mucho mayor entre el día 30 y 60 PV, que la que desarrolló el grupo VMA. Obviamente el antígeno de la VMO para el día 60 PV tuvo más tiempo para ser liberado lo que hace que esté disponible para estimular el sistema inmune durante más tiempo, aumentando la respuesta de los anticuerpos, en este caso de las IgG.

El hecho que el grupo VMA fue el que presentó menor seroconversión entre estos dos días y menor promedio de IgG para el día 60, puede deberse al mecanismo de acción de este adyuvante donde la liberación del antígeno ocurre de manera más rápida alcanzándose ya para el día 30 PV, el 80% del promedio final títulos de IgG. Además, se ha clasificado al hidróxido de aluminio como un adyuvante de menor acción inmunoestimulante en comparación con los adyuvantes oleosos [130,131, 132].

Con respecto al grupo inmunizado con la vacuna polivalente oleosa (VPO), demostró un nivel de seroconversión alto entre los días 30 y 60 PV, llegando haber diferencia significativa a nivel estadístico entre estos dos promedios de IgG. Esto podría atribuirse a la presencia de varios antígenos en la formulación vacunal. El sistema inmunológico está bajo más presión para dar respuesta, por lo que al día 30 se observa el menor promedio de IgG anti rotavirales para este grupo, en comparación con las formulaciones monovalentes

Cabe destacar que aunque el grupo VPO fue el que presentó mayor seroconversión entre los días 30 y 60 PV, en general los 3 grupos de cobayos presentaron aumento de los promedios de IgG al día 60 PV. Figura 14. Nuestros resultados coincidieron con lo establecidos por estudios anteriores [137, 138] donde determinan que en cobayos el día 56 PV, es el día pico o de meseta para la respuesta de los anticuerpos ante la vacunación, aunque Parreño y colaboradores, 2010 [136], establecen para los cobayos que este día, es a los 30 días PV.

Por otro lado el hecho que esta vacuna haya sido formulada con una menor cantidad de antígeno rotaviral WC3, parece influir en el nivel de respuesta IgG. Su promedio de títulos de IgG es menor al compararlo con el promedio obtenido por la VMO, aunque no existe diferencia significativa entre estos dos valores. En la VMO se colocó mayor volumen de antígeno inactivado al momento de la formulación, aunque siempre se mantuvo el mismo orden de magnitud de concentración antigénica para ambas vacunas (10^7 DITC₅₀/mL).



En estudios anteriores se ha demostrado que el cobayo es capaz de discriminar significativamente entre las vacunas formuladas con diferencias en las concentraciones de antígeno de $1 \log_{10}$, mostrando tener buena repetitividad y reproducibilidad [117, 136, 139]. Esta conclusión podría estar relacionada con el hecho que el título infeccioso viral de los antígenos utilizado en la formulación de la vacuna, así como el virus utilizado en los ensayo de seroneutralización se llevaban a cabo utilizando diluciones en base a 10 [136]. Habría que realizar más estudios para poder comprobar si el cobayo es capaz de discriminar entre las vacunas formuladas con diferencias en las concentraciones de antígenos menores a $1 \log_{10}$, o si quizás este efecto pueda deberse a posibles interferencias menores por parte de los distintos antígenos presente en la formulación vacunal.

A pesar de las diferencias en los promedios de IgG que presentaron los 3 grupos de vacunas, todos ya sea al día 30 o 60 PV, obtuvieron valores del promedio de IgG expresado en \log_{10} , superiores al límite previamente establecido de 4,47 para ser consideradas como vacunas satisfactorias (Dra. Viviana Parreño, sección de Virus entéricos INTA. Datos no publicados). Figura 15. Esta observación puede tomarse en cuenta a la hora de diseñar el protocolo de inmunización de los cobayos, donde con la toma de muestra a los 30 días PV sería suficiente para determinar el nivel de potencia de la vacuna. De esta manera se ahorraría tiempo y dinero en el protocolo de inmunización. Lo que se debe mantener en cuenta al reducir los tiempos, es el alto nivel de seroconversión que presento la VPO para el día 60 PV, sobre todo en aquellos posible casos donde la potencia vacunas a los 30 días PV no llegase a alcanzar el limite satisfactorio. Esto es importante ya que la formulación polivalente oleosa es la de principal interés comercial.

Respuesta de los Anticuerpos Neutralizantes

Para el caso de la producción AcN, también se observó mayores títulos de estos anticuerpos para el día 60 PV en comparación con el día 30 PV, existiendo diferencia significativa entre estos dos valores, para todos los grupos de cobayos. EL grupo VMA fue que presento el mayor nivel de conversión entre estos dos puntos de muestreo, aunque para el día 60 PV fue el que presento menor promedio del \log_{10} de los títulos de AcN. Figura 16. Katz y colaboradores 1991 [145], encontraron baja producción de títulos de AcN en ratones inmunizados con vacuna inactivada del virus SemLiki Forest con adyuvante hidróxido de aluminio, en comparación con otras dos formulaciones la cuales presentaron adyuvantes completo de Freund`s y bromuro de dimetil-dioctadecil- amonio.



De otra mano, para el día 60 PV existió una diferencia significativa entre el grupo VMA con respecto al grupo VMO. Este hecho puede atribuirse a la mejor acción inmunomoduladora del adyuvante oleoso en comparación con el acuoso. Otros estudios han reportado una mejor acción de las vacunas con adyuvante oleoso en cuanto a los índices de incidencia y morbilidad en comparación con las vacunas con adyuvantes acuoso como el hidróxido de aluminio durante la vacunación a campo del ganado bovino [140,141].

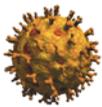
Esta diferencia significativa no se observa entre el grupo VMA y el grupo VPO. El grupo VPO también presentó promedios del \log_{10} de los títulos menores de AcN con respecto a los promedios del grupo VMO. Se vuelve a plantear como posible causa de este fenómeno la menor cantidad de antígeno inactivado que esta formulación recibió, aunque no se descarta una posible interferencia menor entre los antígenos que componen la vacuna.

Respuesta específica de anticuerpos a las proteínas rotavirales

Al estudiar el nivel de reactividad de los anticuerpos generados por vacunación, hacia las proteínas rotavirales de la cepa vacunal pudimos observar, el aparente reconocimiento de todas las proteínas estructurales del virión de RVB cepa WC3, principalmente por parte los sueros que obtuvieron mayores títulos de anticuerpos ya sean IgG totales o AcN. Figura 18.

El hecho que la vacunación haya sido capaz de generar anticuerpos contra cada una de las proteínas estructurales rotavirales de la cepa WC3, demuestra que los determinantes antigénicos de estas proteínas no resultaron afectados por el tratamiento de inactivación viral y que la integridad estructural del virus completo se conservó, a pesar de la inactivación total del virus. Se puede comprobar la alta eficiencia que presenta el BEI como inactivante viral, ejerciendo su acción a través de la alquilación de ácidos nucleídos e inhibiendo la replicación y no degradando el tamaño de los componentes que contienen los determinantes inmunogénicos, como puede ocurrir al usar formaldehidos o fenoles como inactivantes [61, 143, 144]. Un estudio reciente demostró a través del Western Blot como la inactivación viral con formalina de virus envueltos, conduce a una desintegración total de la estructura de los virus inactivados, después el tiempo necesario para una inactivación eficaz [145].

Este resultado también demuestra el alto nivel antigénico e inmunológico que presenta las vacunas formuladas, ya que son capaces de generar respuesta inmune



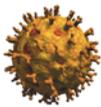
no solo hacia las proteínas principales y más inmunogénicas del virus, sino de todas en las proteínas estructurales virales en su conjunto.

Reacción cruzada entre cepas homologas y heterologas a la WC3 en cobayos vacunados.

Entre todos los resultados obtenidos a través de este ensayo, el que más se presta a discusión es la alta diferencia encontrada entre los títulos AcN alcanzados por las cepa WC3 y cepa INDIANA, las cuales presenta igual serotipo y genotipo de G6 P7 [5]. Tabla 6.

Entre los factores que pudieron influenciar este evento, podemos mencionar que para la comparación entre títulos de AcN entre cepas homólogas y heterólogas siempre se han utilizado sueros hiperinmunes [83]. Sueros de animales convalecientes o sueros no hiperinmunes, suelen no tener buenos resultados para serotipificación. Entra la duda de si nuestros sueros de cobayos a pesar de tener buenos títulos de AcN, entran en la categoría de sueros hiperinmunes. La producción de sueros de este tipo, el virus no está inactivado y es purificado a través de algún gradiente de sedimentación. También se utiliza adyuvante más potentes como el adyuvante de Freud Completo [83, 146].

Por otro lado, en un estudio anterior realizado por Naik y Butler, 1982 [147], también reporta diferentes cinéticas de neutralización en dos cepas de rotavirus bovinos serológicamente relacionadas (Cepa RVB UK y NI) donde plantea que este fenómeno podría deberse al prolongado proceso adaptación y pasajes en cultivo celular que han sufrido la cepas.



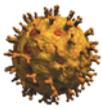
5.4 ENSAYO DE INMUNIZACIÓN EN BOVINOS

A pesar de ser un ensayo que fue realizado con bajo número de animales y de no poseer un diseño de trabajo muy elaborado, es mucha la información que se puede aprovechar del mismo.

Entre los conceptos importantes que habría que tomar en cuentas antes de entrar de lleno en la discusión están:

- La vacunación de las madres bovinas durante el último tercio de la gestación contra el RVD, genera protección contra esta enfermedad en el ternero neonato [33, 74, 100].
- Dado la temprana susceptibilidad de los terneros a la infección por RVD, los anticuerpos pasivos localizados en la luz intestinal y adquirida a través del calostro o de la leche juegan un rol importante en la protección contra la infección y la enfermedad por RVD. Existe una alta correlación entre los títulos de anticuerpos anti - RVD en el calostro, en la cantidad que es consumida por el ternero y en el nivel de protección que este adquiere al ser desafiado con RVD [148].
- A medida que progresa la lactación y el calostro se transforma en leche ocurre una marcada disminución del contenido de inmunoglobulinas (Ig) en estas secreciones, principalmente de la IgG1, para el caso de los rumiantes, ya que esta es la Ig, predominante tanto a nivel del calostro como nivel de la leche [52, 148].
- La administración de leche suplementada con calostro inmune de madres vacunadas, induce protección en el ternero contra el RVD de manera dosis dependiente [84].
- La mayor incidencia del complejo de diarrea neonatal en ternero ocasionado por RVD ocurre entre la 1^{era} y 3^{era} semana de vida [31, 33, 30]. La susceptibilidad de la enfermedad está relacionada, con el decline dramático de los anticuerpos anti - RVD en la leche, principalmente durante la 1 semana post parto, pero también puede estar relacionada por la limitada protección local provista por el transporte reverso de IgG séricos a la luz intestinal, sobre todo en terneros con bajos títulos de IgG séricos [148].

Uno de los propósitos principales de este ensayo fue determinar qué nivel de títulos de IgG era capaz de estimular la vacunación a nivel del calostro y en la leche de las hembras vacunadas, de manera de generar un panorama de cómo era el nivel de



protección que recibía un ternero una vez que la madre era vacunada con nuestro producto. Se escogió utilizar para este ensayo la formulación VPO, por ser esta la formulación de principal interés comercial.

Respuesta de la vacunación en las madres.

Así observamos mayores títulos de IgG totales en las muestra de calostro a las 48 horas post nacimiento (PN) y de leche a los 7, 15 y 21 PN, de las hembras vacunadas con respecto a la no vacunadas. Tabla 7.

A nivel de calostro obtuvimos una diferencia de 12 veces entre los dos grupos. A nivel de la leche se observó la típica disminución de títulos de IgG para ambos grupos, aun así, las hembras vacunadas presentaron títulos más altos de IgG hasta de 26 veces (día 15 PN). Cabe destacar que todas las madres ya poseían títulos de IgG anti -RVB, de entre 1024 y 4096, por lo que se puede concluir la existencia de circulación del RVB en el establecimiento. Tabla 8.

Por otro lado es posible no haber observado una mayor distancia entre los títulos de IgG a nivel de calostro, debido a que el grupo control estuvo conformado por vacas de mayor edad y números de parto. Se sabe que estos dos factores influyen en la cantidad y calidad de calostro producido [52, 53]. De allí la importancia de generar grupos balanceados al momento de realizar algún estudios, de manera de disminuir en la medida de lo posible factores externos al estudios.

El rango de diferencia de títulos de IgG entre los grupos, fue mayor a nivel de la leche, que a nivel calostrual, por lo que se pudo obtener mejores beneficios de la vacunación en este punto. Tabla 7.

Esto es importante ya que estudios anteriores [84, 148], han determinado que el consumo de una leche suplementada con calostros con altos títulos de IgG1 por parte de ternero las primeras semanas de vida le provee un adecuado nivel de protección cuando es desafiado con RVB, donde no ocurre ningún signo de enfermedad entérica y la excreción de virus a través de materia fecal es dramáticamente reducida. Por ello la administración de leche suplementada con calostro inmune a RVB proveniente de madres vacunadas con 2 o 3 dosis, durante los primeros 14 días de vida del ternero es uno de los principales manejos que se recomienda, (después de la vacunación de las hembras preñadas) para la prevención de este síndrome.

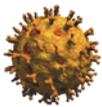


La leche del grupo vacunado obtuvo promedios de IgG de 3072, 1024 y 768 para los días 7, 15 y 21 PN respectivamente. En un estudio de Parreño y colaboradores 2010 [84], comprueba que leche suplementada con títulos de IgG de entre 4096 a 1024, administrada durante los primeros 14 días de vida, genera una protección de 80% a 37,5 % respectivamente, en los terneros al ser desafiado, con una dramática reducción de la excreción viral a través de las heces y disminución de la severidad de los signos clínicos en aquellos que desarrollaron la enfermedad. Por otro lado Saif y colaboradores 1983 [148], demostró que leche suplementada con títulos de IgG1 de 2413, administrada solo durante los primeros 7 días de vida, genera en los terneros desafiados, protección parcial contra el RVB con retraso en la aparición y disminución tanto de la gravedad, de la duración de la diarrea y de la diseminación del virus a través de las heces.

Si analizamos nuestros resultados podemos decir que nuestros títulos de IgG en la leche se encuentran semejantes a los de los dos estudios mencionados. A pesar que en estas investigaciones se basaron en mediciones de IgG1 podemos hacer tal comparación ya que el IgG1 representa como mínimo el 80% de los IgG totales en calostro y leche bovina. [52, 53]. Con un promedio de títulos de IgG de 3072 en la leche durante la primera semana de vida, la cual es una de las de mayor susceptibilidad, podemos decir que nuestros terneros hijos de madres vacunadas (GV), se encontraban con una alta probabilidad de estar protegidos contra RVB. Ha esto se suma el alto título de IgG que este grupo presentó a nivel sérico, los que participan también en la protección al ser transferidos hacia la luz intestinal.

En las semanas siguientes (15 y 21 días PN) a pesar de disminuir títulos de IgG en leche de las madres vacunadas, estos representan una protección al menos parcial en los terneros contra RVB, la cual no está presente en los terneros hijos de madres no vacunadas (GC), por los bajos títulos de IgG que presentaron en la leche de estas madres para esos momentos. Tabla 7.

Esto se puede corroborar en nuestros resultados, ya que ninguno de los terneros GV presentó sintomatología diarreica. Aunque no se realizó desafío viral, como una medida de asegurar que todos los terneros entraran en contacto con el RVB, pudimos observar presencia de sintomatología diarreica y excreción de virus en los 2 terneros GC. Lo que abre la posibilidad que los terneros GV si hayan entrado en contacto con el RVB a nivel de campo y resultaran protegidos a la enfermedad. Tampoco se detectó presencia de antígenos RVB en las muestras de materia fecal (MF) de los terneros GV. A pesar de no haber realizado muestreo diario de este material, los momentos recolectados fueron suficientes para detectar presencia de estos antígenos en las muestras MF de los terneros GC.



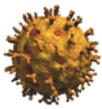
La leche producida entre los 7 a 30 días post parto, posee en términos generales el 1% de los títulos de anticuerpos que estuvieron presentes en el calostro de las madres vacunadas [148]. En madre no vacunada con bajos títulos de anticuerpos anti- RVB, no es posible detectar estos anticuerpos en leche después de los 7 post partos [100]. La leche de las madre vacunadas se mantuvo con títulos de IgG de alrededor del 1% de los títulos presentado en el calostro (196608), hasta el día 15 PN.

Por otro lado la concentración de Igs en el calostro es mayor de 4 a 10 veces que la concentración de Igs de suero de la madre al momento del parto [52]. Al momento del parto las madres vacunadas presentaron un promedio de títulos de IgG de 40960 es cual es 5 veces menor que el promedio de títulos de IgG presente en el calostro. Este título IgG sérico aumento en las madre vacunadas 21 días PN. Por lo que si se hubiese respectado en tiempo recomendado para realizar la vacunación antes del parto con las dos inmunizaciones correspondientes (60 y 30 días antes del parto), se hubiesen logrado mejores títulos de anticuerpos a nivel de calostro. Se ha determinado una disminución de la expresión de los receptores Fc de las IgG a nivel de la glandula mamaria después de la fase de calostrogenesis, lo que disminuye el nivel de IgG sericas que son transferidas hacia la leche [151]. Por lo que las IgG presentes el la leche estan en un 70% producidas por el tejido linfoide mamario, el 30 % restante tiene origen serico [54, 55]. El realizar revacunación al día 60 pre parto puede ayudar a contribuir que los títulos de IgG en leche puedan mantener un buen nivel en las primeras semanas de vida del ternero.

En bovinos, solo con el efecto *booster* de la revacunación, con una vacuna inactivada oleosa, se puede lograr aumentar el doble o más, de los títulos de anticuerpos que se obtuvieron con la primo vacunación [150]. Por lo que si se realizara proyecciones sobre los títulos de IgG que se pudieron haber alcanzado en calostro y leche al realizar la revacunación, se podría observar un mejor nivel de eficacia para la vacuna generada.

A pesar contratiempos, la inmunización logro inducir altos títulos de anticuerpos en calostro y leche. Con un adecuado plan de vacunación nuestra vacuna pudiese ser la mejor opción para controlar la enfermedad en los hatos de carne, donde la suplementación de los terneros con calostro inmune, es difícil de aplicar por las características del manejo de rebaño que se realiza en eso tipos de establecimientos.

Por otro lado estos contratiempos tampoco afectaron el nivel de seroconversión que presentaron las madres vacunadas al momento del parto y a los 45 días PV (1.3



y 1.4 respectivamente). Estos valores, fueron mayores al establecido como mínimo (0.75) para poder considerar a la eficacia vacuna como satisfactoria.

Respuesta de la vacunación en los terneros.

Con respecto a las muestra de los terneros, el análisis de las misma es complejo, y debe realizarse en conjunto con todos los datos obtenido.

Iniciando con los terneros GV, estos alcanzaron títulos IgG a nivel del suero de manera dependiente a los títulos de IgG presente en el calostro que consumieron. Ocurrió la característica disminución de los anticuerpos pasivos ya sean IgG o AcN en las primeras semanas de vida. Los títulos de IgG excretado a nivel de MF presentaron correlación con los títulos de IgG séricos y con los títulos de IgG en la leche. Tabla 10. De hecho estos pudieron provenir a partir de la leche consumida, o a partir de la transferencia de IgG del suero hacia la luz intestinal, inclusive de ambas vías. La principal vía de eliminación de los IgG1 adquiridos pasivamente en terneros es la esta transferencia suero – luz intestinal. Aproximadamente el 70 % de esta inmunoglobulina es eliminada por esta ruta [57].

No hubo detección de antígeno de RVB en ninguna de las muestras MF ni presencia de sintomatología de diarrea durante todo el ensayo. Por ende podemos decir que los 3 terneros GV aparentemente fueron protegidos contra el desarrollo de la enfermedad y excreción viral de RVB.

El caso fue contrario para los 2 terneros GC donde estos presentaron signos diarreicos y detección de antígenos de RVB en las muestras de MF acorde con la disminución de los títulos de IgG en estas muestras, a nivel sérico y a nivel de la leche con la que se alimentaron. Por lo que se traduce que estos animales al momento de presentar el síndrome diarreico se encontraban en una posición de alta susceptibilidad a la enfermedad. En estudios anteriores se ha observado que durante la excreción del RVB en las heces también existe disminución de los títulos de IgG1 en las mismas [58]. Figura 21.

El hecho de la disminución de los títulos de IgG en las muestras de MF donde se detectó antígenos de RBV puede deberse a la participación de las misma en la neutralización del virus y en la reducción de su replicación viral. Tabla 10.

El aumento de los títulos de anticuerpos ya sean AcN o de IgG que presentaron estos terneros posterior a la enfermedad, está indicando el desarrollo una respuesta inmunitaria activa. Parreño y colaboradores, 2004 [58], plantean que los IgG1 anti



- RVB de la inmunidad pasiva, afecta negativamente a la respuesta inmune activa de una manera dosis-dependiente. Por lo que claramente los terneros GC pudieron desarrollar un respuesta inmune, pero acorde y limitada por los títulos de IgG a nivel sérico e intestinales, que estos animales presentaron al momento de la infección.

Bajos títulos de IgG pasivos impiden el desarrollo de una adecuada respuesta inmune contra RVB, a la vez que no son capaces de proteger al ternero de la infección y del desarrollo de la enfermedad [58]. De allí la importancia del proceso de vacunación en establecimientos como en el que se elaboró este ensayo, donde la circulación natural del RVB genera ciertos niveles de anticuerpos en las madres, pero no lo suficientes para proteger al ternero del virus sin una previa vacunación a la madre.

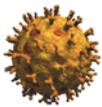
Nivel de protección heterologa en las madres y terneros

Estudios anteriores han comprobado que la amplia respuesta inmune a diversos serotipos de RVB en calostros y sueros bovinos puede deberse a un reflejo de repetidas infecciones con los diferentes serotipo de RVB, a los cuales responde el animal. [74, 82, 124].

Cuando realizamos este ensayo pudimos comprobar la generación de cierto nivel de protección cruzada para la cepa B223 la cual es una cepa heterologa para la WC3. Al no haberse aplicado ningún plan de vacunación contra el RVB anteriormente en el establecimiento, podemos aseverar que la producción de AcN contra la cepa B223 en las hembras vacunadas se debió a la pre-existencia de inmunidad heterologa para este subtipo.

Este nivel de protección fue siempre menor al nivel de protección generado hacia la propia cepa vacunal. Por otro lado un hallazgo interesante fue el aumento observado de los AcN principalmente hacia la cepa WC3, en los terneros GC posterior a la infección por RVB que sufrieron los mismos. Este aumento no fue tan marcado para la cepa B223, por lo que se podría pensar que la cepa de campo que infecto a los terneros GC esta reaccionada serológicamente al serotipo de la WC3. Tabla 11.

Al mencionar que podría estar relacionada con la cepa WC3 nos inclinamos a pensar, que está relacionada más específicamente con el tipo G6 de la WC3. Se demostró que en Argentina, los subtipo P[5] predominan principalmente en los establecimiento de producción de carne, y los establecimiento tipo tambo (como es en este caso), existe similar circulación de G6 y G10 asociados a P[11] [149].



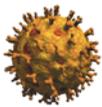
Existe una clara diferencia en la distribución de los G/P tipos de RVB la cual es dependiente del tipo de establecimiento [149].

Esta particular distribución de los genotipos se corrobora para Uruguay en un estudio preliminar realizado, donde entre las zonas estudiadas, se encuentra departamento de San José que es donde está ubicado el establecimiento donde se realizó nuestro ensayo [42]. En las muestras solo se detectó genotipos G6, G10 y P [11]. Todas estas muestras provenían de explotaciones tipo tambo. Basándonos en estos hallazgos, es que nos inclinamos a pensar que la cepa de RVB que circula a nivel de campo en el establecimiento del ensayo, está principalmente relacionada con el G6 de la WC3 y no con el P[5] de esta cepa. En acciones próximas e debe realizar identificación del genotipo de la cepa de RVB de campo que afecto al grupo de Terneros GC a través de RT PCR heminested mutiplex.

A partir de lo anteriormente planteado, podemos ratificar la importancia, de la inclusión de más de un genotipo de RVB en la formulación de la vacunal. Al menos de cepas serológicamente diferente como pueden ser la WC3 y B223. La protección cruzada generada a partir de nuestra vacuna la cual posee una sola cepa de RVB en su formulación, no fue la más adecuada. Al generar buenos títulos de anticuerpos para varias cepas de RVB, aseguras un mejor papel protector del proceso de vacunación en los animales inmunizados, más aun a sabiendas que genotipos de RVB similares a las cepas vacunales incluidas, están en circulando endémicamente en la zona.



6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS



La inmunización de animales con vacunas de gran calidad es el principal medio de control de muchas enfermedades animales. Estas enfermedades son tan diversas y complejas como las mismas especies a las cuales pueden afectar. Por lo que el desarrollo de una vacuna de uso veterinario es un esfuerzo económico que toma muchos años. Hay muchos obstáculos que superar para lograr el desarrollo y la puesta en marcha de una vacuna veterinaria.

Con el objetivo principal de esta tesis, se buscó iniciar el recorrido del largo camino que representa colocar en el mercado uruguayo y regional, una nueva opción de vacuna contra el RVB, pero realizada en Uruguay. Esto solo se logra cuando se cuenta con la pertinente autorización otorgada por las agencias oficiales de regulación y control de productos veterinarios. La autorización solo es expedida cuando se garantiza que el producto cumple satisfactoriamente aspectos como calidad, inocuidad y eficacia. En el desarrollo de esta tesis se aunaron esos requerimientos necesarios para la obtención de un producto con fines aplicados junto al interés y aprendizaje académico que implica su realización.

A pesar de existir nuevas y mejores tecnologías para la producción de vacunas de nueva generación basadas en la genómica y proteómica, se decidió iniciar la investigación en este campo de vacunas contra el RVB, con el uso de los métodos de producción clásicos, tradicionales y bien validados, con una vasta experiencia de producción y una larga historia de uso. A partir de los resultados aportados por esta tesis, se podrá comenzar a diseñar nuevas propuestas para mejorar la calidad del producto y muy posiblemente producir una vacuna contra el RVB de nueva generación. En esa perspectiva lo próximo a realizar debe ser la inclusión de otra cepa de RVB, de genotipo distinto a la cepa vacunal WC3, de manera de ampliar el nivel de protección generado en el bovino vacunado.

Principalmente porque aparte del genotipo de la WC3 G6 P[5], también circulan otros genotipos serológicamente no relacionados como el G10, el P[11], posiblemente un G8, en diversas combinaciones. En nuestro ensayo de protección heteróloga en bovinos, a pesar que las madres vacunas desarrollaron cierto nivel de AcN contra la cepa B223, este nivel de protección fue siempre menor al nivel de protección generado hacia la propia cepa vacunal. De no incluir otras cepas de RVB a la formulación vacunal, siempre que realicemos vacunaciones, estaremos a expensa del nivel pre-existente de inmunidad heteróloga, que posea el animal vacunado, para que genere una buena respuesta inmune contra cepas distintas a la cepa vacunal. En estos casos el nivel de respuesta heteróloga estará influenciado



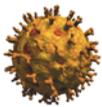
por la edad del bovino, donde los terneros hijos las vacas más jóvenes y novillas, estarán en desventaja.

Una cepa candidata adecuada para ser incluida podría ser la cepa B223, ya que posee genotipo semejante a los circulantes principalmente en los establecimientos tipo tambo, se tiene previa experiencia en su multiplicación y titulación y porque presenta buenos niveles de replicación viral al realizarle pasajes, alcanzando títulos virales acordes con los necesarios para generar antígeno vacunal.

Así mismo remarcamos algo que puede ser obvio pero que se concluye del desarrollo de esta tesis que es la importancia de realizar procesos de producción de vacunas con materia prima (biológica o no), homogéneas, debidamente caracterizadas, de origen definido, de calidad aceptable y con garantía de esterilidad. Por otro lado es importante también el uso de métodos establecidos y bien estandarizados, la aplicación de buenas prácticas de laboratorio y el uso de equipos e instrumentos adecuados, que se encuentren en óptimas condiciones. Por último, es fundamental contar con el trabajo y asesoramiento de un personal altamente calificado, con experiencia en estas áreas laborales. Todos estos factores al ejercer su acción en conjunto, haciendo que el proceso de producción de un lote vacunal, sea eficiente, confiable y de alta calidad.

El diseño y la producción de una nueva vacuna siempre está acompañado de un robusto estudio científico sobre la caracterización de los mecanismos de infección del patógeno y la naturaleza de la respuesta inmune frente a la infección en el huésped, los cuales sirven como base para definir las pautas que debe cumplir el proceso de vacunación en los animales inmunizados. Durante esta tesis se cumplió con esos procesos en forma satisfactoria.

En cuanto a la validación de las técnicas realizadas en esta tesis, en general se trata de demostrar pruebas reales de que el sistema cumple lo previsto. Se pueden generar resultados experimentales de elevada reproductibilidad, pero si el proceso de validación del ensayo no se realiza de forma adecuada, dichos resultados podrían poseer errores en cuanto al nivel de presencia o ausencia de la sustancia a analizar (*analytes*). En el desarrollo de esta tesis todos los ensayos a los cuales se les considero como validados, se repitieron un número de veces, con el uso de diferentes muestras patrón, las cuales contenían concentraciones distintas del *analytes* y en situaciones variadas, a manera de poder detectar la posible existencia de errores en los resultados. Para el caso de la técnica de ELISA para la detección de antígeno de Rotavirus implementada en esta tesis, proponemos a futuro la realización de más repeticiones con muestras de MF o suspensiones virales



previamente analizadas por ELISA KERI. También proponemos la realización de un posible interlaboratorio con la sección de Virus Entéricos, del Instituto de Virología del INTA – Argentina, de manera de aumentar la confiabilidad analítica de todas las técnicas desarrolladas

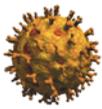
Por otro lado, de los ELISA estandarizados para la tesis, ya sea para la detección de Antígenos de RVB o para la detección de Anticuerpos IgG anti-RVB, se generaron dos instructivos bajo el Sistema de Control de Calidad del Laboratorio Santa Elena, para la elaboración fiable y exacta reproducción de estos métodos.

En concordancia con lo establecidos por otros autores y con la sección de virus entéricos del INTA en Argentina, los cobayos funcionaron bien como sistema biológico, reaccionando con una alta y fina respuesta inmunológica, cuando son inmunizados con vacunas contra RVB generada por este proyecto de tesis, al realizar la determinación de la potencia vacunal de la misma.

En el ensayo de potencia en cobayos, para el día 60 post inoculación (PI) la VMO obtuvo mayores títulos de anticuerpos ya sean AcN o IgG totales, seguida por la VPO. No hubo diferencias significativas entre los resultados de estas dos formulaciones. La VMA fue la que presentó menores títulos de anticuerpos para el día 60 PI ya sea IgG totales o AcN. Existió diferencia significativa en los resultados de AcN entre la VMA y VMO para ese momento. Las 3 vacunas superaron el límite de potencia establecido para considerar la vacuna satisfactoria, para los días 30 y 60 PV. Este límite fue establecido por la sección de virus entéricos del INTA – Argentina en estudios anteriores realizados sobre el nivel de correlación entre títulos de Anticuerpos en cobayos y títulos de Anticuerpos en bovino.

Ahora en vista que la VPO se obtuvo niveles de inducción de anticuerpos, ya sean IgG o AcN, menores que la VMO, es importante realizar estudios sobre esta formulación polivalente, para confirmar que no hay interferencia entre los componentes individuales, es decir, que un componente no cause una disminución en la respuesta inmunológica protectora de otro, en este caso del RVB. Esto es particularmente importante, en la perspectiva de generar una nueva vacuna que incluya otra cepa de RVB, y otros antígenos de los principales agentes causantes de diarrea en terneros, entre los cuales se encuentra el Coronavirus Bovino y antígenos de *Escherichia coli*.

Por otro lado, sería interesante estudiar, si los bajos niveles de inducción de anticuerpos se debieron a la menor cantidad de antígeno colocada en la VPO en comparación con la VMO y no a una interferencia antigénica. De ser cierta esta hipótesis, se podría estar demostrando la capacidad del cobayo de diferenciar



potencias vacunales entre vacunas que difieren de la cantidad de antígeno en menos de $1\log_{10}$.

Por último los ensayo inmunológicos vacunales, a nivel de campo están diseñados para demostrar la eficacia en las condiciones de trabajo, y para detectar reacciones inesperadas, que pueden no haberse observado durante el desarrollo del producto.

En este ensayo de eficacia vacunal a nivel de campo, la vacuna logro inducir altos títulos de anticuerpos a nivel de suero, calostro y leche en las madres inmunizados, con respecto a las madres controles. La presencia de títulos de anticuerpos IgG y AcN, en todas las vacas del ensayo, indican la existencia de circulación de cepas de RVB en el establecimiento.

Los buenos títulos de IgG alcanzado por las madres vacunadas en la leche, se mantuvieron hasta el día 21 PN. Esto no ocurrió en las madres del grupo control. En los terneros GV, se alcanzó un buen nivel de inmunidad pasiva, durante la realización del ensayo ninguno de los terneros mostro sintomatología diarreica ni se detectó antígenos rotavirales en las muestras de heces. En estas muestras de detecto altos títulos de IgG hasta el día 15 PN, lo que podría indicar la existencia un buen nivel de protección contra el RVB a nivel intestinal. Los dos terneros GC, presentaron sintomatología diarreica y se les detecto antígenos rotavirales a nivel de las heces los días 15 y 21 PN con bajos títulos de IgG para esos momentos. Por lo tanto los niveles de inmunidad pasiva y de protección contra el RVB fue directamente proporcionales a los títulos de anticuerpos presente en el calostro y leche de sus respectivas madres. En acciones próxima se debe realizar identificación del genotipo de la cepa de RVB de campo que afecto al grupo de Terneros GC a través de RT PCR heminested mutiplex

Por otro lado en ensayos de este tipo, hay muchas variables no controladas que pueden hacer difícil obtener buenos datos de eficacia. Aspecto como un buen diseño de ensayo, creación de grupo experimentales adecuado, una buena coordinación previa de los tiempos a necesitar para desarrollo del ensayo, y llevar a cabo el mismo de manera meticulosa día a día, hace que se puedan obtener mejores resultados sobre la eficacia y el desarrollo en general del proceso de vacunación.

Algunos de los resultados obtenidos en cuanto a los títulos de anticuerpos generados en las madres vacunadas, pudieron no ser los más óptimos debido a fallas en una buena coordinación del ensayo. Como consecuencia puede haberse subestimado el nivel de eficacia de la vacuna, al no respetar el tiempo adecuado para la primovacuna, al no haber realizado la revacunación correspondiente y al no



haberse generado grupos experimentales más balanceados y con mayor número de animales.

Por ello sería adecuado repetir la experiencia, cumpliendo con todas las características anteriormente mencionadas, e introducir una variable más como podría ser la realización de la comparación con otra vacuna contra el RVD que se encuentre en el mercado actualmente.

Como conclusión final se puede decir, que se obtuvo un resultado muy satisfactorio en la producción de la vacuna inactivada contra el RVD, con la utilización de la cepa de RVD WC3, en aspectos importantes como a nivel de calidad, inocuidad y potencia vacunal, tanto a nivel de los cobayos como a nivel de los bovinos vacunados.



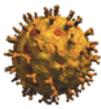
7. BIBLIOGRAFÍA



1. Estes, M.K. AND Kapikian, A.Z. 2007. **Rotaviruses**. 5th. ed. *Fields Virology*. Vol. 53: p.1918-1974.
2. Prasad, B. V.; Burns, J. W.; Marietta, E.; Estes, M. K. y Chiu W. 1990. **Localization of VP4 neutralization sites in rotavirus by three-dimensional cryo-electron microscopy**. *Nature*. 343: p. 476-479.
3. Prasad, B. V.; Wang, G. J.; Clerx, J. P. y Chiu, W. 1988. **Three-dimensional structure of rotavirus**. *J. Mol. Biol.* 199: p.269-275.
4. Shaw, A. L.; Rothnagel, R.; Chen, D.; Ramig, R. F.; Chiu, W.; y Prasad, B. V. 1993. **Three-dimensional visualization of the rotavirus hemagglutinin structure**. *Cell*. 74: p.693-701.
5. Chen, D. Y.; Estes, M. K. y Ramig, R. F. 1992. **Specific interactions between rotavirus outer capsid proteins VP4 and VP7 determine expression of a cross-reactive, neutralizing VP4-specific epitope**. *J. Virol.* 66: p. 432-439.
6. Sánchez, S.M.; Tomas, Claudia, L.; Arias, Carlos F.; López Susana. 2004. **Characterization of Rotavirus Cell Entry**. *Journal of Virology*. 78: p. 2310–2318.
7. Kapikian, A. Z.; Hoshino, Y. y Chanock, R. M. 2001. **Rotaviruses**. 4th. ed. *Fields Virology*. Vol 2: p.1787-1883.
8. Pesavento, J.B.; Crawford, S. E.; Estes, M.K. 2006. **Rotavirus Proteins: Structure and Assembly**. En: Polly Roy. **Reoviruses: Entry, Assembly and Morphogenesis**. Londres, Springer, p. 190 – 211.
9. Dormitzer, Philip R.; **Rotavirus**. En: Mandell, Gerald L.; Bennett, Jhon E.; Dolin, Laphael. **Enfermedades infecciosas: principios y práctica**. 6ta. ed. Vol 2. Madrid, Elsevier, p 1902 – 1913.
10. Georges-Courbot, M. C.; Beraud, A. M.; Beards, G. M.; Campbell, A. D.; Gonzalez, J. P.; Georges, A. J. y Flewett, T. H. 1988. **Subgroups, serotypes, and electropherotypes of rotavirus isolated from children in Bangui, Central African Republic**. *Journal of Clinical Microbiology*. 26: p. 668-671.
11. Beards, G. M.; Desselberg, U. y Flewett, T. H. 1989. **Temporal and geographical distributions of human rotavirus serotypes, 1983-1988**. *Journal of Clinical Microbiology*. 27: p. 2827-2833.



12. Mohammed, K. A.; Assouli, S. M. y Banjar, Z. M. 1994. **Human rotavirus subgroups and serotypes in children with acute gastroenteritis in Saudia Arabia from 1988 to 1992.** *Journal of Medical Virology*. 44: p. 237-242.
13. López, S.; Espinosa, R.; Greenberg, H. B. y Arias, C. F. 1994. **Mapping the subgroup epitopes of rotavirus protein VP6.** *Virology*. 204: p.153-162.
14. Tang, B.; Gilbert, J. M.; Matsui, S. M. y Greenberg, H. B. 1997. **Comparasion of the rotavirus gene 6 from different species by sequence analysis and localization of subgroupspecific epitopes using site-direct mutagenesis.** *Virology*. 237: p. 89-96.
15. Hoshino Y.; Sereno M. M.; Midthun, K; Flores, J.; Kapikian, A. Z. y Chanock, R. M. 1985. **Independent segregation of two antigenic specificities (VP3 and VP7) involved in neutralization of rotavirus infectivity.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 82: p. 8701-8704.
16. Rodger, S. M. y Holmes, I. H. 1979. **Comparison of the genomes of simian, bovine and human rotaviruses by gel electrophoresis and detection of genomic variation among bovine isolates.** *Journal of Virology*. 30: p. 839-846.
17. Hoshino, Y.; Wyatt, R. G. y Greenberg, H. B. 1984. **Serotypic similarity and diversity of rotaviruses of mammalian and avian origin as studied by plaque-reduction neutralization.** *The Journal of Infectious Diseases*. 149: p. 694-702.
18. Hoshino Y. y Kapikian, A. Z. 1996. **Classification of rotavirus VP4 and VP7 serotypes.** *Archives of Virology*. 12: p. 99-111.
19. Rao, C. D.; Gowda, K. y Reddy, Y. 2000. **Sequence analysis of VP4 and VP7 genes of nontypeable strains identifies a new pair of outer capsid proteins representing novel P and G genotypes in bovine rotaviruses.** *Virology*. 276: p. 104-113.
20. Estes, M. K. 2001. **Rotaviruses and their replication.** 4rd edition *Fields Virology*. vol 2: p.1747-1785.
21. Mattion, N. M.; Cohen, J. y Estes, M. 1994. **The rotavirus proteins.** En: Kapikian, A. Z. **Viral infections of the gastrointestinal tract.** New York, Marcel Dekker, p. 169-249.
22. Park, Sung-Hee; Saif, Linda J.; Cheol Jeong, Guem-Ki Lim; Park, Sang-Ik; Ha-Hyun, Kim, Su-Jin; Park, You-Jung; Kim, Jae-Ho; Jeong, Mun-Il, Kang y



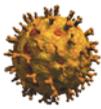
- Cho, Kyoung-Oh. 2006. **Molecular Characterization of Novel G5 Bovine Rotavirus Strains.** *Journal of Clinical Microbiology.* 44: p. 4101– 4112.
23. Jourdan, N.; Maurice, M. y Delautier, D. 1997. **Rotavirus is released from the apical surface of cultured human intestinal cells through nonconventional vesicular transport that bypasses the Golgi apparatus.** *Journal of Virology.* 71: p. 8268-8278.
24. Roy, J.H. 1980. **Factors affecting susceptibility of calves to disease.** *J. Dairy Sci.* 63: p. 650-664.
25. Tzipori, S., 1981. **The etiology and diagnosis of calf diarrhoea.** *Vet. Rec.* 13: p. 510-515.
26. Acres, S.D. 1985. **Enterotoxigenic Escherichia coli infections in newborn calves: a review.** *J. Dairy Sci.* 68: p. 229-256.
27. Simhon, A. 1985. **Virología de los rotavirus y epidemiología de la Diarrea por rotavirus.** *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana.* 98: p. 295-308.
28. Flewett, T.H. y Woode, G.N. 1978. **The rotaviruses.** *Alch. Virol.* 57: p. 1-23.
29. House, A.J. 1978. **Economic impact of rotavirus and other neonatal disease agents of animals.** *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 173: p. 573-576.
30. McNulty, M.S. 1978. **Rotaviruses.** *J. Gen. Virol.* 40: p.1-18.
31. Mebus C. A; Underdahl N. R.; Rhodes M. B. y Twiehaus M. J. 1969. **Calf diarrhea (scours): reproduced with a virus from field outbreak.** *Nebraska Agricultural Experimental Station Research Bulletin.* 233: p. 1-16.
32. Mebus C. A; White R. G.; Baas, E. P.; Twiehaus M. L. 1973. **Immunity to neonatal calf diarrhea virus.** *J. Am Vet Med Assoc.* p. 163:880-3.
33. Bridger L.C.; Woode G.N.; 1975. **Neonatal calf diarrhoea: identification of reovirus like (rotavirus) agent in feces by immunofluorescence and immune electron microscopy.** *Br. Vet.* 131: p. 528-35.
34. Ciarlet, Max; Hyser, Joseph M.; Estes, Mary K. 2002. **Sequence Analysis of the VP4, VP6, VP7, and NSP4 Gene Products of the Bovine Rotavirus WC3.** *Virus Genes.* 24: p. 107 – 108.



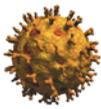
35. Sonodgrass, D. R.; Fitzgerald, T.; Campbell, I.; Scott, F. M. M.; Browning, G.F.; Miller D. L.; Herring, A. J. y Greenberg, H. B. 1990. **Rotavirus serotypes 6 and 10 predominate in cattle.** *J. Clin. Microbiol.* 28: p. 504-507.
36. Taniguchi H.; Urasawa T. y Ursawa, S. 1991. **Molecular and antigenic analyses of serotypes 8 and 10 of bovine rotaviruses in Thailand.** *Journal of General Virology.* 72: p. 2929 – 2937.
37. Parreño, Viviana. 2008. **Diarrea Neonatal Bovina: Protegerlos desde la Panza.** *Revista Angus.* 241: p. 61-65.
38. Saif, Linda y Fernández, Fernando. 1996. **Group A Rotavirus Veterinary Vaccines.** *The Journal of Infectious Diseases.* 174: p. 98-106.
39. Clark, H.F.; Furukawa, T.; Bell, L. M; Offit, P. A.; Perrella, P. A.; Plotkin, S. A. 1986. **Immune response of infants and children to low-passage bovine rotavirus (strain WC3).** *Am J Dis Child.* 140: p. 350-356.
40. Parreño, Viviana. 2004. **Complejo diarreico neonatal del ternero.** [Internet], VET – UY. Disponible desde: <http://www.vet-uy.com/articulos/bovinos/150/0130/bov130.htm> [Acceso 12 de febrero 2012].
41. Garaicoechea, L.; Bok, K.; Jones, L. R.; Combessies, G.; Odeón, A.; Fernandez, F.; Parreño, 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: p. 1 – 11.
42. Bengochea, V.; Alberti, A.; Escobar, R.; Reolon, E.; Arbiza, J.; Berois, M. Septiembre 2011. **Epidemiología Molecular de Diarreas Bovinas de Etiología Viral en Uruguay.** Poster presentado en el X Congreso Argentino de Virología, Buenos Aires, Argentina.
43. Saif, Linda y Smith, Larry. 1985. **Enteric Viral Infections of Calves and Passive Immunity.** *J. Dairy Sci.* 68 p. 206-228.
44. Hall, G.A.; Bridger, J. C.; Parsons, K. R.; Cook, R. 1993. **Variation in rotavirus virulence: a comparison of pathogenesis in calves between two rotaviruses of different virulence.** *Vet Pathol.* 30: p. 223-233.
45. Theil, K. W.; Bohl, E. H. y Agnes, A. G. 1977. **Cell Culture Propagation of Porcine Rotavirus (Reovirus-like Agent).** *Am. J. Vet. Res.* 38: p. 1765.



46. Wyatt, R. G.; Janes, W. D.; Bohl, E. H.; Theil, K. W. y Saif, L. J. 1980. **Human rotavirus type 2: Cultivation in vitro.** *Science.* 207: p.189
47. Mebus, C. A., Newman, L. E. 1977. **Scanning electron, Light and Immunofluorescent Microscopy of Intestine of Gnotobiotic Calf Infected with Reovirus-like Agent.** *Am. J. Vet. Res.* 38: p. 553.
48. Acres, S. D.; Sannders, J. R. y Radostits, O. M. 1977. **Acute undifferentiated neonatal diarrhea of beef calves: The prevalence of enterotoxigenic E. coli, Reo-like (rota) virus and other Enteropathogens in cow-calf herds.** *Can. Vet. J.* 18: p. 113.
49. Marsolais, G.; Assaf, R.; Montpetit, C. y Marois, P. 1978. **Diagnosis of Viral Agents Associated with Neonatal Calf Diarrhea.** *Can. J. Comp. Med.* 42: p. 168.
50. Woode, G. N., and Bridger, J. C. 1978. **Isolation of small viruses resembling astroviruses and caliciviruses from acute enteritis of calves.** *J. Med. Microbiol.* 11: p. 441.
51. Desseberger, U. Gray J. 2006. En: Zuckerman, A. J. **Principles and Practice of Critical Virology** 5th ed. Wiley – Blackwell, Chennai, India. p. 249 – 270.
52. Tizard, Ian R. 2009. **Introducción a la Inmunología Veterinaria.** 8va ed. Texas, Estados Unidos.
53. Paggi, Priscila; Lissarrague, Cesar; Bilbao, Gladys. 2011. **Evaluación de la Transferencia de Inmunoglobulinas Calostrales en Terneros Neonatos.** Director: BILBAO, Gladys. UNCPBA, Buenos Aires, Argentina. p. 1 - 42.
54. Mensik, J.; Dressler, J.; Franz, J. y Pokorny, J. 1977. **Effect of different colostrums feeding on blood immunoglobulin level in calves.** *Veterinary Medicina.* 22: p. 449-446.
55. Boudry, C.; Buldgen, A.; Portetelle, D.; Collard, A.; Thewis, A.; Dehoux, J.P. 2007. **Effects of oral supplementation with bovine colostrum on the immune system of weaned piglets.** *Res. Vet. Sci.* 83: p 91–101.
56. Menanteau-horta, A.M.; Ames T.R.; Johnson D.W.; Meiske J.C. 1985. **Effect of Maternal Antibody Upon Vaccination With Infectious Bovine Rhinotracheitis and Bovine Virus Diarrhea Vaccines.** *Canadian Journal of Comparative Medicine.* 49: p.10-14.



57. Hodgins, D. C.; Yuan, L.; Parreño, V.; Corbeil, L.; Saif, L. **Mucosal Veterinary Vaccines: Comparative Vaccinology**. En: Bienenstock, John; Mestecky, Jiri; Lamm, Michael E.; Mcghee, Jerry R.; Strober, Warren. **Mucosal Immunology**. 3ra. ed. San Diego, USA, Elsevier p.1084 – 1104.
58. Parreño, V.; Béjar, C.; Vagnossi, A. 2004. **Modulation by colostrum-acquired maternal antibodies of systemic and mucosal antibody responses to rotavirus in calves experimentally challenged with bovine rotavirus**. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 100: p7-24.
59. Saif, L. J. 1985. **Passive immunity to coronavirus and rotavirus infections in swine and cattle: enhancement by maternal vaccination**. En: Tzipori S. **Infectious diarrhea in the young**. Amsterdam, Elsevier. p. 456-467.
60. Besser TE, Gay ec, McGuire TC, Evermann JF. 1988. **Passive immunity to bovine rotavirus infection associated with transfer of serum antibody into the intestinal lumen**. *J Virol.* 62: p. 2238-2242.
61. Smith, M. L.; Fitzmaurice, W. P.; Turpen, T. H. y Palmer, K. E. 2009. **Display of Peptides on the Surface of Tobacco Mosaic Virus Particles**. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 332: p.13-31.
62. Habib, Mudasser; Hussain, Iftikhar; Irshad, Hamid; Yang, Zong-zhao; Shuai, Jiang-bing; Chen, Ning. 2006. **Immunogenicity of formaldehyde and binary ethylenimine inactivated infectious bursal disease virus in broiler chicks**. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B.* 7: p. 660 – 664.
63. Aguilar, Rubido Julio C. y Leal, Angulo María de Jesús. 2000. **Adyuvantes vacunales: estado actual y nuevas tendencias**. *Biotecnología Aplicada.* 17: p.147-160.
64. Aucouturier, J.; Dupuis, L.; Ganne, V. 2001. **Adjuvants Designed for Veterinary and Human Vaccines**. *Vaccine.* 19: p. 2666–2672.
65. Franco, Diego A.; Giraldo, Mónica L.; Patiño, Pablo J. 2004. **Papel de los adyuvantes en la modulación de la respuesta inmune**. *Rev. Col Cienc. Pec.* 17: p. 280 - 288.
66. Mebus CA, White RG, Baas EP, Twiehaus ML. 1973. **Immunity to neonatal calf diarrhea virus**. *Am Vet Med Assoc.* 163: p. 880-883.
67. Saif, L. J. 1988. **Passive immunity to enteric viral infections: bovine rotavirus**. *Adelantos en Microbiología Enfermedades Infecciosas.* 7: p. 86-109.



68. Saif, L. J.; Smith, K.L.; Landmeier, B. L.; Bohl, E. H.; Theil, K.W.1984. **Immune response of pregnant cows to bovine rotavirus immunization.** *Am. J. Vet. Res.* 45: p. 49-58.
69. Saif, L. J.; Smith, K.L. 1985. **Enteric viral infections of calves and passive immunity.** *J. Dairy. Sci.* 68: p. 206-28.
70. Leeuw, P. W.; Ellens D. J.; Talmon, F. P.; Zimmer, G. N.; Kommerij, R. 1980. **Rotavirus infections in calves: Efficacy of Oral Vaccination in Endemically Infected Herds.** *Res. Vet. Sci.* 29: p. 142- 147.
71. Acres, S. D.; Radostits, O. M. 1976. **The efficacy of a modified live reo-like virus vaccine and an E. coli bacterin for prevention of acute undifferentiated neonatal diarrhea of beef calves.** *Can. Vet. J.* 17: p.197-212.
72. Bellinzoni, R.C.; Blackhall, J.; Baro, N. 1989 **Efficacy of an inactivated oil- adjuvanted rotavirus vaccine in the control of calf diarrhea in beef herds in Argentina.** *Vaccine.* 7: p. 263-269.
73. Conner, M.E.; Zarley, Parsons, S.; Drabinski, D.; Greiner, S.; Smith, R.; Jiang, B.; Corsaro, B.; Barniak, V.; Madore, H. P.; Crawford, S.; Estes, M. K. 1996. **Virus-like particles as a rotavirus subunit vaccine.** *Journal of Infectious Diseases.* 174. Suppl: p. 88-92.
74. Snodgrass D.R.; Ojeh, O. K.; Campbell, I.; Herring, A.I. 1984. **Bovine rotavirus serotypes and their significance for immunization.** *J. Clin Microbiol.* 20: p. 342- 346.
75. Michelle, Arnold; Patton John T.; Mcdonald Sarah M. 2009. **Culturing, Storage, and Quantification of Rotaviruses.** *Current Protocols in Microbiology.* p. 15C.3.1- 15C.3.24.
76. Wolf, J. L.; Cukor, G.; Blacklow, N.R.; Dambrauskas, R.; Trier, J. S. 1981. **Susceptibility of mice to rotavirus infection: effects of age and administration of corticosteroids.** *Infect. Immun.* 33: p. 565-574.
77. Fitzgerald, G.R.; Welter, M.W.; Welter, C.J. 1986. **Evaluating the performance of a porcine rotavirus vaccine.** *Vet. Med.* 81: p.188-192.
78. Pickering, L.K.; Morrow, A. L.; Herrera, I. 1995. **Effect of maternal rotavirus immunization on milk and serum antibody titers.** *J. Infect. Dis.* 172: p. 723- 728.



79. European Commission. 1998. **Good Manufacturing Practices**. Vol 4. Medicinal products for human and veterinary use. Directorate General III – *Industry Pharmaceuticals and cosmetics*.
80. Brussow, H.; Walther, J.; Fryder, V.; Sidoti, J.; Bruttin, A. 1988. **Cross-neutralizing antibodies induced by single serotype vaccination of cows with rotavirus**. *J. Gen. Virol.* 69: p. 1647-1658.
81. Parreño, Viviana; Rodríguez, Daniela; Izuel, Mercedes; Filippi, Jorge; Marangunich, Laura; López, Virginia; Fernández, Fernando; Bellinzoni, Rodolfo. 2009. **Bovine rotavirus vaccines: Immunogenicity of two strains of bovine rotavirus in cattle and guinea pigs**. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 128: p. 347.
82. Gerald, N.; Woode, Nancy E.; Kelso, Terry F. Simpson, Susan K.; Gaul, Lawrence E. Evans; Lorne, Babiuk. 1983. **Antigenic Relationships Among Some Bovine Rotaviruses: Serum Neutralization and Cross-Protection in Gnotobiotic Calves**. *Journal of clinical microbiology*. 18: p. 358 – 364.
83. Cornaglia, E.M.; Fernández, F.; Gottschalk, M.; Barrandeguy, M.; Luchelli, A.; Pasini, M.I.; Saif, L.; Parraud, J.R.; Romat, A. y Schudel, A.A. 1992. **Reduction in morbidity due to diarrhea in nursing beef calves by use of an inactivated oil - adjuvant rotavirus- Escherichia coli vaccine in the dam**. *Vet. Microb.* 30: p. 191-202.
84. Parreño, V.; Marcoppido, G.; Vega, C.; Garaicoechea L.; Rodriguez, D.; Saif, L.; Fernández F. 2010. **Milk supplemented with immune colostrum: Protection against rotavirus diarrhea and modulatory effect on the systemic and mucosal antibody responses in calves experimentally challenged with bovine rotavirus**. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 136: p. 12–27.
85. Arias, C. F.; Romero, P.; Alvarez, V. y López, S. 1996. **Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity**. *J. Virol.* 70: p. 5832-5839.
86. López, S.; Arias, C. F., Bell, J. R.; Strauss, J. H. y Espejo, R. T. 1985. **Primary structure of the cleavage site associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity**. *Virology*. 144: p.11-19.
87. Reed, L. J. y Muench, H., **A simple method of estimating fifty per cent endpoints**. *Am. J. Hyg.* I 938, 27: p. 493-497.



88. BEGIN, E. 1980. **Enhanced production of infectious rotavirus in BSC-1 cell cultures by various factors in the presence or absence of trypsin.** *Journal of General Virology*. 51: p. 263-270.
89. Hodgins, D. C.; Kang, S. Y.; Arriba, L.; Parreño, V., Ward, L. A.; Yuan, L.; To, T.; Saif, L. J. 1999. **Effects of maternal antibodies on protection and development of antibody responses to human rotavirus in gnotobiotic pigs.** *J. Virol.* 73: p. 186-197.
90. Gouvea V.; Ho, M. S.; Glass, R.; Woods, P.; Forrester, B.; Robinson C.; Ashley R.; Riepenhoff-Talty M.; Clark H. F.; Taniguchi K.; Meddix E.; McKellar B., Pickering L. 1990. **Serotypes and electrophoretotypes of human rotavirus in the USA: 1987-1989.** *J. Infect. Dis.* 162: p. 362-367.
91. Gentsch J. R.; Glass, R.I.; Woods, P.; Gouvea, V.; Gorziglia, M.; Flores, J.; Das, B. K.; Bhan, M.K. 1992. **Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction.** *J. Clin. Microbiol* 30: p. 1365-1373.
92. Gouvea, V.; Santos, N.; Timenetsky, M, C. 1994. **Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR.** *J. Clin. Microbiol.* 32: p. 1338-1340.
93. Gouvea, V.; Santos, N.; Timenetsky, M, C. 1994. **VP4 typing of bovine and porcine group A rotaviruses by PCR.** *J. Clin. Microbiol.* 32: p.1333-1337.
94. Office International des Epizooties. (OIE). 2000. **Manual of Recommended Diagnostic Techniques and Requirements for Biological Products** Vol II. 4ª. Edición. Paris. Francia. p. 62 - 75.
95. COUNCIL OF EUROPE. 2009. **EUROPEAN PHARMACOPOEIA** .5ª Ed. Council of Europe, Strasbourg, Francia.
96. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Biologics Evaluation and Research. 2010. **Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Materials Used in the Production of Viral Vaccines for Infectious Disease Indications.** [Internet]. Disponible desde: <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>. [Acceso 09 de Enero 2012].
97. Van Kuppeveld, F. J. M.; Johansson, K. E.; Galama, J. M. D.; Kissing, J.; Bolske, G.; Van Der Logt, J. T. M. y Melchers, W. J. G. 1994. **Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by a Mycoplasma Group-Specific PCR.** *Appl Environ Microbiol.* 60: p. 149-152.



98. Path y Alliance, Gavi. 2006. **The Development of Live, Attenuated Rotavirus Vaccines**. Seattle, Estados Unidos p. 46
99. Leaniz, Rafael y Calvo, Aníbal F. 2003 **Botulismo Animal**. *Boletín Técnico ACINTACNIA. Órgano de difusión del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias INTA-CASTELAR*. Argentina. 10: p. 14.
100. Snodgrass, David R.; Fahey, Kevin J.; Wells, Peter W.; Campbell, Iris y Whitelaw, Alexander. 1980. **Passive Immunity in Calf Rotavirus Infections: Maternal Vaccination Increases and Prolongs Immunoglobulin G1 Antibody Secretion in Milk**. *Infection and Immunity*. 28: p. 344-349.
101. Cornaglia, E. M.; Barrandeguy, M.; Fitjman, N.; Schudel, A. A. 1989. **Enzyme linked immunosorbent assay, immunofluorescent test and electrophoresis analysis of rotaviral RNA in the diagnosis and characterization of the bovine rotavirus**. *Rev. Latinoam. Microbiol.* p. 59-62.
102. Tomasini, Victoria; Parreño, Viviana. 2008. **Elisa KERI Detección de Rotavirus Grupo A**. *Instructivo IVD009 del Instituto de Virología, Instituto nacional de Tecnología Agropecuaria, INTA*. Argentina.
103. Gerna, Giuseppe; Battaglia, Massimo; Milenesi, Gabriele; Passarani, Nilda; Percivalle, Elena; Cattaneo, Ercole. 1984. **Serotyping of Cell Culture-Adapted Subgroup 2 Human Rotavirus Strains by Neutralization**. *Infection and Immunity*. 43: p. 722-729.
104. Fernandez, F. M.; Conner, M. E.; Parwani, A. V.; Todhunter, D.; Smith, K. L.; Crawford, S. E.; Estes, M. K. y Saif, L. J. 1996. **Isotype-specific antibody responses to rotavirus and virus proteins in cows inoculated with subunit vaccines composed of recombinant SA11 rotavirus core-like particles (CLP) or virus-like particles (VLP)**. *Vaccine*. 14: p. 1303-1312.
105. Fernandez, F.M.; Conner, M.E.; Hodgins, D.C.; Parwani, A.V.; Nielsen, P.R.; Crawford, S.E.; Estes, M.K. y Saif, L.J. 1998. **Passive immunity to bovine rotavirus in newborn calves fed colostrum supplements from cows immunized with recombinant SA11 rotavirus core-like particle (CLP) or virus-like particle (VLP) vaccines**. *Vaccine*. 16: p. 507-516.
106. Tomasini, Victoria; Parreño, Viviana. 2008. **ELISA para la Detección de Ac IgG Anti Rotavirus Grupo A en Muestras Bovinas o de Cobayos**. *Instructivo IVD008 del Instituto de Virología, Instituto nacional de Tecnología Agropecuaria, INTA*. Argentina.



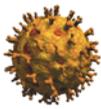
107. Parreño, Viviana. 2000. **ROTAVIRUS - Semipurificación viral por colchón de sacarosa al 40%: PROTOCOLO B.** *Instituto de Virología, Instituto nacional de Tecnología Agropecuaria, INTA.* Argentina.
108. Bradford, M.M. 1976. **A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding.** *Anal Biochem.* 72: p. 248-54.
109. Laemmli, U. K. 1970. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature.* 227: p. 680-85.
110. De Laney, D. B.; Morrow, C. J.; Read, Kelly M. y Tannock, G. A. 1998. **The development and evaluation of two tissue culture-grown Marek's disease challenge viruses.** *Avian Pathology.* 27: p. 472-477.
111. Yoshiki, TSuchiya; Isamu Tagaya; y Takashi, Tsuruhara. 1969. **Titration and Extensive Serial Passages of Yaba Virus In Vitro.** *Japan. J. Microbiol.* 13: p. 103-117.
112. Cooper, P.D. 1961. **The plaque assay of animal viruse.** En: Smith, Kenneth M. y Lauffer A. Max. **Advances in virus Research** Vol.8 Elsevier, New York, Estados Unidos. p. 319 – 374.
113. ATCC. 2010. **ATCC Connection.** Vol. 30 (1). ISSN 1088-2103 p. 23
114. Robertson, G. M. y Egerton, J. R. 1977. **Micro-assay systems for infectious laryngotracheitis virus.** *Avian. Dis.* 21: p.133- 135.
115. Organización Mundial de la Salud. 1999. **Reglamentación de vacunas: desarrollo en los organismos actuales de reglamentación farmacéutica.** Ginebra. p. 56.
116. The Office of the Federal Register National Archives and Records Administration. CFR. 1996. **Code of Federal Regulations. Animal and Animal products.** No. 9 Parte 1 a 199. Washington D.C. Estados Unidos.
117. Office International des Epizooties. (OIE). 2000. **Manual of Standars for Diagnostic Tests and Vaccines.** 4ª ed. Paris. Francia. p. 4-23, 34-52, 145-154.
118. U.S. Pharmacopeia. 2000. **The standard of quality. USP XXIV. NF 19.** Washington D.C. Estados Unidos. Cap.7: p.1818-1823.



119. Lennette, E.D. y Schmidt, N. J. 1979 **Diagnostic procedures for viral, rickettsia and chlamydial infections.** 5ta ed. Washington DC: American Public Health Association.
120. Yosuke, Murakami; Nobuyoshi, Nishioka; Yuji, Hashiguchi y Chikara Kuniyasu. 1983. **Serotypes of Bovine Rotaviruses Distinguished by Serum Neutralization.** *Infection and Immunity.* 40: p. 851-855.
121. Sato, K., Inaba, Y.; Shinozaki, T. y Matumoto, M. 1981. **Neutralizing Antibody to Bovine Rotavirus in Various Animal Species.** *Veterinary Microbiology.* 6: p. 259- 261.
122. Huang, Jin-an; Nagesha, Hadya S; Snodgrass, David R. y Holmes. 1992. **Molecular and Serological Analyses of Two Bovine Rotaviruses (B-11 and B-60) Causing Calf Scours in Australia.** *Journal of Clinical Microbiology.* 30: p. 85-92.
123. Wyatt, Richard G.; James, Harvey D.; Pittman, J.R., Annie L.; Hoshino, Yasutaka; Greenberg, Harry B.; Kalica, Anthony R.; Flores, Jorge y Kapikian, Albert Z. 1983. **Direct Isolation in Cell Culture of Human Rotaviruses and Their Characterization into Four Serotypes.** *Journal of Clinical Microbiology.* 18: p. 310-317.
124. Davenport, F. M.; Hennessy, A. V. y FRANCIS, T. J. R (1953). **Epidemiological and immunological significance of age distribution of antibody to antigenic variants of influenza virus.** *Journal of Experimental Medicine.* 98: p. 641- 650.
125. Brussow, Harald; Walther, Isabelle; Fryder, Vincent; Sidoti, Josette y Bruttin Anne. 1988. **Cross-neutralizing Antibodies Induced by Single Serotype Vaccination of Cows with Rotavirus.** *J. Gen. Virol.* 69: p. 1647-1658.
126. Dellepiane, N.; Griffiths, E. y Milstien, J. B. 2000. **Nuevos retos para asegurar la calidad de las vacunas.** Artículo publicado en ingles en el *Bulletin of the World Health Organization.* 78: p. 155-162.
127. Darsie, G.C.; Cunha, R, G.; Gomes, I. 1992. **Tratamiento de virus con Triclorotrifluoretano para la Produccion de vacuna Antiaftosa en sistema Industrial.** *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa,* 58: p. 5 – 9.
128. Shixia, Wang; Pavlo, Sakhatsky; Te-Hui, W. Chou; Shan, Lu. 2005. **Assays for the assessment of neutralizing antibody activities against Severe**



- Acute Respiratory Syndrome (SARS) associated coronavirus (SCV).**
Journal of Immunological Methods 301: p. 21– 30.
- 129.** Bogaerts, H. 2005. **Cervical cancer and the pathway to prevention: The promise of an HPV vaccine.** 23: p. 39-42.
- 130.** Schirmbeck, R; Melber, K; Mertens, T; Reimann, J. 1994. **Antibody and cytotoxic T-cell responses to soluble hepatitis B virus (HBV) S antigen in mice: implications for the pathogenesis of HBV-induced hepatitis.** *J Virol.* 68: p. 1418–1425.
- 131.** Traquina, P; Morandi, M; Contorni, M; Van Nest, M. F. 1994 **Adjuvant enhances the antibody response to recombinant hepatitis B surface antigen vaccine in primates.** *J Infect Dis.* 174: p. 168–175.
- 132.** Brewer, J.M; Conacher, M.; Satoskar, A.; Bluethmann, H.; Alexander, J. 1996. **In interleukin-4-deficient mice, alum not only generates T helper 1 responses equivalent to Freund's complete adjuvant, but continues to induce T helper 2 cytokine production.** *Eur J Immunol.* 26: p. 2062–2066.
- 133.** Fernández, F.M.; Smitsaart, E.; Barrandeguy, M., San Roman, a.l.; Sadir, A.M.; Zabal, O., Marcovechio, J.F. y Schudel, A.A. 1994. **Estudio de la respuesta inmune en bovinos vacunados con vacuna antiaftosa combinada con Herpesvirus bovino- 1 y Vacuna antiaftosa combinada con rotavirus Escherichia coli enteropatógena.** *RLA* 25: p. 111-119.
- 134.** Luchelli, Alejandro; Fondevila, Norberto; Ricci, L.; Romat, P.; Maliandi, F. y Schudel Alejandro A. 1997. **Ensayos de vacunación simultánea a campo.** *Avances en Ciencias Veterinarias* 12: p. 52 – 56.
- 135.** PARKMAN, P. 1995. **Combined and Simultaneously administered Vaccines.** En Williams y colaboradores. **Combined Vaccines and Simultaneous Administration-Current Issues and Perspectives.** Ed. J. Annals of the New York Academy of Sciences ISBN 0-89766-862-6.
- 136.** Parreño, Viviana; López, María Virginia; Rodríguez, Daniela; Vena, María Marta; Izuel, Mercedes; Filippi, Jorge; Romera, Alejandra; Faverind, Claudia; Bellinzoni, Rodolfo; Fernandez, Fernando; Maranguniche, Laura. 2010. **Development and statistical validation of a guinea pig model for vaccine potency testing against Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) virus.** *Vaccine* 28: p. 2539–2549.
- 137.** Alonzo, P.; Reolón, E.; Acuña P.; Leaniz, R.; Puentes, R.; Lavarello, L.; Maisonnave, J. 2008. **Evaluación de un modelo en cobayo (Cavia porcellus)**



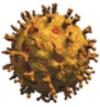
- para estudiar la inmunogenicidad de vacunas comerciales inactivadas contra Herpesvirus bovino.** *Veterinaria.* 44: p. 7 – 15.
- 138.** Silva, D.G.; Montassier, H.J.; Oliveira, R.G.; Fuentes, D.B.; Samara, S.I. Jerez, J.A; Buzinaro, M.G. 1986. **Avaliação da imunidade passiva em bezerros nascidos de vacas imunizadas com vacina contra rotavirus.** *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 60: p.1089-1096.
- 139.** Fernández, F.; CostantinI, V.; Barrandeguy, M.; Parreño, V.; Schiappacassi, G.; Maliandi, F.; Leunda, M.; Odeón, A. 2009. **Evaluation of experimental vaccines for bovine viral diarrhea in bovines, ovines and guinea pigs.** *Revista Argentina de Microbiología.* 41: p. 86-91.
- 140.** Mello de Augé; Astudillo, Vicente; Gomes, Ivo y Campos Garcia, J.T. 1978. **Aplicación en el Campo de una vacuna Antiaftosa Olesosa e inactivada: vacunación y revacunación de Bovinos Jovenes.** *Bltm Centro panamericano Fiebre Aftosa.* 19 - 20: p. 31- 37.
- 141.** Abaracon, D. y Olascoaga, R.C. 1984. **Vacinas contra a febre aftosa.** *A hora veterinária.* 17: p. 45- 52.
- 142.** Katz, D; Lehrer, S; Galan, O; Lachmi, B. E. y Cohen, S. 1991. **Adjuvant effects of dimethyl dioctadecyl ammonium bromide, complete Freund's adjuvant and aluminium hydroxide on neutralizing antibody, antibody-isotype and delayed-type hypersensitivity responses to SemLiki Forest virus in mice.** *Microbiol Immunol.* 3: p. 305-320.
- 143.** Mussgay, M.; Bergold, G.; Weiland, E.; Ueberschar, S. 1972. **Preparation and evaluation of inactivated Venezuelan Equine Encephalitis.** *Vaccines. Zbl. Vet. Med. B.* 19: p. 511-517.
- 144.** Mussgay, M.; Weiland, E. 1973. **Preparation of inactivated vaccines against alphaviruses using SemLiki Forest Virus. White mouse as a model. II Evaluation of formalin-inactivated vaccines treated with Tri (n-butyl) phosphate and or Saponin and Properties of the inactivated virus.** *Intervirol.* I: p. 269-277.
- 145.** Barrett, Noel; Kistner, Otfried y Dorner, Friedrich. 2007. **Procedimiento para la inactivación de virus envueltos.** *Boletín Europeo de Patentes.* 2270501: p. 1 – 15.



146. Harry, B.; Greenberg, Phuoc, T. V. y RONALD JONES. 1986. **Cultivation and Characterization of Three Strains of Murine Rotavirus.** *Journal of Virology.* 57: p. 585-590.
147. NAIK, T. N. y BUTLER, M. 1982. **The Differentiation of Calf Rotaviruses by Plaque Morphology and Serum Neutralization.** *J. gen. Virol.* 59: p. 427-430.
148. Saif, Linda J.; Redman, Donald R.; Smith, K. Larry y Theil, Kenneth W. 1983. **Passive Immunity to Bovine Rotavirus in Newborn Calves Fed Colostrum Supplements from Immunized or Nonimmunized Cows.** *Infection and Immunity.* 41: p. 1118-1131.
149. Garaicoechea, L.; Bok, K.; Jones, L.R.; Combessies, G.; Odeón, A.; Fernandez, F.; Parreño, 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: p. 1–11.
150. Biogénesis. 2005. **Bioaftogen®, Vacuna Antiaftosa de Biogénesis.** *Folleto de Información de laboratorio.* p. 1 - 14.
151. Timothy T. Kuo, Kristi Baker, Masaru Yoshida Shuo-Wang Qiao, Victoria G. Aveson, Wayne I. Lencer, Richard S. Blumberg. 2010. **Neonatal Fc Receptor: From Immunity to Therapeutics.** *J Clin Immunol* 30: p. 777–789 *J Clin Immunol* (2010) 30:777-789



8. ANEXOS



8.1 Constancia de elaboración de Instructivos Bajo el Sistema de Control de Calidad del Laboratorio Santa Elena para las técnicas de ELISA estandarizadas para la tesis, ELISA detección de Antígenos de RVB y ELISA para la detección de Anticuerpos IgG anti-RVB.



Fecha: 01-mar-12

Constancia de Documentación Generada en trabajo de maestría

1. **Objeto:** Por la presente Laboratorios Santa Elena S.A., empresa uruguaya dedicada a la fabricación de medicamentos y vacunas de uso veterinario desea dejar constancia de la tarea realizada por la Dra. Tibisay Escobar en nuestra empresa.
2. **Descripción de la empresa:** Tiene como principal objetivo la elaboración, distribución y exportación de productos destinados a la sanidad animal, así como también el desarrollo e implementación de biotecnologías aplicadas a la realidad de la región. Por más información consultar nuestra página web http://www.santaelena.com.uy/juc_360_1.html
3. **Nombre del pasante:** Tibisay Escobar
4. **Período de actividad:** Años 2010 y 2011.
5. **Descripción de tareas desarrolladas:** La tareas que realizó están enmarcada dentro de los objetivos de Investigación y Desarrollo de Santa Elena S.A.: estandarización de la técnica y redacción de los procedimientos operativos estándar de control de potencia y titulación de vacunas contra rotavirus bovino.
Dicha labor se condensa en los documentos: (CCA-RCR-059) Prueba inmunogenicidad en cobayos contra RVB, (CCA-PCE-060) Titulación de anticuerpos de RVB por ELISA y (CCA-REC-066) Titulación de antígenos de RVB por ELISA. Por poseer esta documentación carácter confidencial y de uso exclusivo de Santa Elena S.A., no se adjunta al presente documento.
6. **Firma de la constancia.** Firman la presente constancia

Lic. Eduardo Revolón
Jefe de Virología - Coordinador I & D

DMV Gonzalo Ináñez
Director Técnico

Página 1/1