

Evaluación de un modelo en cobayo (*Cavia porcellus*) para estudiar la inmunogenicidad de vacunas comerciales inactivadas contra Herpesvirus bovino^a

Alonzo, P.¹; Reolón, E.²; Acuña P.²; Leaniz, R.²; Puentes, R.¹; Lavarello, L.³; Maisonnave, J.^{1*}.

RESUMEN

En el presente trabajo se evalúa el modelo cobayo para estudiar el potencial inmunogénico de una vacuna inactivada contra Herpesvirus bovino-1 (BoHV-1) agente etiológico de la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina, teniendo como indicador el título de anticuerpos neutralizantes inducido en los animales vacunados. Para ello se utilizaron 30 bovinos y 35 cobayos. Diez animales de cada especie se utilizaron como control sin inmunizar. Se inmunizaron 20 bovinos y 25 cobayos con dos dosis (día 0 y 21) de una vacuna comercial inactivada que contiene antígenos de herpesvirus bovino tipo 1 y 5 (BoHV-1, BoHV-5), virus de diarrea viral bovina tipo I (BVDV-1), *Leptospira interrogans* y *Campylobacter fetus*. La cinética de la respuesta de Anticuerpos (Acs) Neutralizantes anti BoHV-1 fue cuantificada utilizando la técnica de Seroneutralización *in vitro* (SN), hasta los 133 días desde el inicio del ensayo en los bovinos y cobayos. Los títulos de anticuerpos neutralizantes se expresan como el recíproco de la mayor dilución del suero capaz de inhibir el efecto citopático causado por el BoHV-1. Los títulos máximos de Acs neutralizantes observados fueron entre 128 y 256 alcanzados a los 35 días por el 60% de los bovinos. En el 68% de los cobayos los títulos máximos entre 32 y 128 se alcanzaron a los 56 días. Los mismos descendieron por debajo del título protector de 8 a los 133 días en ambas especies. Los valores observados son relativamente similares a los estimados por el modelo cobayo, donde la abscisa del título máximo es aproximadamente a los 35 días del inicio del experimento (die) y la abscisa de título 8 se alcanza a los 120 días aproximadamente. El valor de p del modelo cobayo fue de 0.0000, el coeficiente de determinación $R^2 = 84.67$ y el error típico de estimación $SE = 0.2666311$.

Estos resultados permitieron validar el modelo cobayo para evaluar el potencial inmunogénico del BoHV-1 en una vacuna inactivada y estimar los títulos de Acs neutralizantes que serían inducidos en bovinos.

Palabras clave: evaluación, vacunas BoHV, modelo cobayo

SUMMARY

The objective of the present work was to evaluate the guinea pig as a model to study the immunogenicity of inactivated Bovine herpesvirus – 1 (BoHV-1) vaccines, etiological agent of Infectious Bovine Rhinotracheitis. Thirty bovines and 35 guinea pigs were used, where 10 animals per species were used as controls. Twenty bovines and 25 guinea pigs were immunized and boosted 21 days later, with a commercial vaccine containing inactivated BoHV-1 and 5, Bovine Viral Diarrhea virus type I (BVDV-1), *Leptospira interrogans* and *Campylobacter fetus* as antigens. The BoHV-1 neutralization antibody (Ab) response curve was evaluated by *in vitro* neutralization test up to 133 days post priming for bovines and guinea pigs. Ab titers were expressed as the reciprocal of the highest serum dilution that inhibited the cytopathic effect produced by the BoHV-1 challenge virus.

Maximum neutralizing Ab titers between 128 and 256 were observed at 35 days post priming in 60% of the bovines, and titers between 32 and 128 were observed at 56 days post priming in 68% of the guinea pigs. In both species, at 133 days post priming, BoHV-1 neutralizing Ab decreased below the titer of 8. The observed values are relatively similar to the ones estimated by the guinea pig model, where the abscissa of the maximum titer is at approximately 35 days post priming and the abscissa of the minimum titer of 8 is at approximately 120 days post priming. The p-value of the model was 0.0000, $R^2 = 84.67\%$, $SE = 0.2666311$.

These results allowed us to validate the guinea pig model to evaluate the immunogenicity of an inactivated BoHV-1 vaccine and estimate bovine BoHV-1 neutralizing titers based on the guinea pig model.

Keywords: guinea pig model, BoHV vaccine, evaluation

^aApoyo financiero: Departamento de Desarrollo e Innovación, Laboratorios Santa Elena S.A.

¹Área de Inmunología, Facultad de Veterinaria, Lasplacas 1550, Montevideo CP 11600, Uruguay.

²Laboratorios Santa Elena, S.A. Millán, Montevideo CP, Uruguay.

³Bioestadística, Facultad de Veterinaria, Lasplacas 1550, Montevideo CP 11600, Uruguay.

* Autor de contacto: Maisonnave, Jacqueline, Lasplacas 1550, Montevideo CP 11600, Uruguay, Tel: 598-2-6281303, Fax: 598-2-6280130, e-mail: jacmaiso2004@yahoo.com.

Recibido: julio de 2008 Aprobado: noviembre de 2008

INTRODUCCIÓN

El Herpesvirus Bovino (BoHV) es el agente etiológico de la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR), Vulvovaginitis Pustular Infecciosa (IPV) y Balanopostitis Pustular Infecciosa (IPB) (Roizmann *et al.*, 1992). Pertenecen a la familia **Herpesviridae**, subfamilia **Alphaherpesvirinae** y género **Varicellovirus**.

Se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial (Baker, 1995; Tikoo *et al.*, 1995). Es un virus envuelto, de ADN doble cadena de aproximadamente 136 kilobases (kb) que codifica, al menos, 69 proteínas (Schwyzer and Ackermann, 1996). Basados en análisis con enzimas de restricción, se han identificado tres subtipos: 1.1, 1.2a y 1.2b. Los subtipos 1.1 y 1.2a se han asociado principalmente con cuadros respiratorios, conjuntivitis, signos clínicos nerviosos, infertilidad y abortos. BoHV-1.2b está fundamentalmente asociado a casos de IPV/IPB, pero no se lo ha relacionado con abortos (Metzler *et al.*, 1985; Miller *et al.*, 1991). BoHV-1 se ha aislado en Europa (Ackermann and Engels, 2006; Karhs, 1987), Estados Unidos (Miller, 1955) y en los países de la Región, como Argentina y Brasil (D'Arce *et al.*, 2002; Pidone *et al.*, 1999). El BoHV fue aislado por primera vez en Uruguay en 1981 (Guarino *et al.*, 1982). En el año 1999 el subtipo 1.1 fue aislado de un ternero con sintomatología nerviosa (Alonzo *et al.*, 2002) y en 2002 y 2004, se aislaron otras dos cepas caracterizadas como subtipo 1.2 (Puentes *et al.*, 2007).

En Uruguay la seroprevalencia de BoHV-1 fue estimada en un 45 y 48 % para ganado de carne y leche, respectivamente (Saizar, 1997). Posteriormente se encontró que 99.1% de los establecimientos lecheros poseen al menos un animal positivo y la prevalencia estimada fue de 36.6% (Repiso *et al.*, 2005).

El control de estas enfermedades en nuestro país se basa fundamentalmente en el uso de vacunas inactivadas polivalentes de diferentes marcas nacionales e importadas. Para garantizar la efectividad de las vacunas es necesario implementar pruebas que valoren objetivamente la protección (pruebas de potencia con desafío) (Pospisil *et al.*, 1996; Vallat, 2004)

o cuantificar el poder inmunogénico de las vacunas (Silva *et al.*, 2007a; Vallat, 2004). La valoración de la respuesta inmune humoral en la especie destino a través de la detección de anticuerpos (Acs) neutralizantes es recomendada por organismos internacionales de regulación y utilizada por varios autores (Babiuk *et al.*, 1996; CFR, 2008; DesCoteaux *et al.*, 2003; Edwards *et al.*, 1986; Fulton *et al.*, 1995; Meeusen *et al.*, 2007; Van Donkersgoed *et al.*, 1991).

El organismo de regulación de Estados Unidos de América «Code of Federal Regulation» (CFR), menciona que una vacuna debe proteger de signos clínicos a los animales cuando se infectan y reducir la cantidad de virus excretado. A su vez la vacuna debe ser aprobada y para ello debe cumplir con los test que evalúan la inocuidad, eficacia y potencia. Inocuidad: los animales vacunados serán observados a diario por reacciones adversas en especial en el lugar de inoculación. Eficacia: se deben desafiar los animales vacunados con virus virulento en condiciones de laboratorio. Potencia: se realiza una prueba con ocho terneros susceptibles a BoHV-1 (seronegativos para BoHV-1), cinco serán vacunados y tres controles, se colectará suero de todos los animales a los 14 días de recibida la segunda dosis (35 días post inicio del experimento) y se inactivarán a 56°C. Los sueros se evaluarán individualmente por la técnica de seroneutralización *in vitro*. Al menos 4 de los 5 animales vacunados deben mostrar títulos superiores a 8 (CFR, 2008).

La utilización de bovinos para estas pruebas si bien ideal resulta en costos muy elevados, por tal motivo se estudian los modelos en animales de laboratorio, que permiten obtener resultados extrapolables a un costo menor. Los cobayos (*Cavia porcellus*) han sido utilizados como modelos de diversas infecciones virales (Baba *et al.*, 1987) y para evaluar la protección inducida por vacunas (Goddard *et al.*, 1986; Schleiss, 2008; Silva *et al.*, 2007b; Smeed and Leonhardt, 1994; Yao *et al.*, 2008). La medición de los anticuerpos neutralizantes ha sido utilizada como método económico indirecto de evaluar la eficacia de las vacunas, basados en estudios que comparan

el título de anticuerpos neutralizantes con pruebas de desafío para varios virus de interés veterinario (Meeusen *et al.*, 2007) y específicamente para BoHV (Patel, 2005). En Argentina y Brasil se han realizado ensayos en cobayos para evaluar el poder inmunogénico de las vacunas virales inactivadas, comparando resultados con los obtenidos en la especie bovina, con el propósito de que las autoridades las utilicen para control de las vacunas existentes en el mercado (Parreño *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2007b). También se ha utilizado la medición de anticuerpos neutralizantes para evaluar vacunas en otros animales de laboratorio como el conejo (Donofrio *et al.*, 2006). Silva *et al.* (2007b) utilizan una sangría a tiempo fijo, 56 días post inicio del experimento, para evaluar la inmunogenicidad de vacunas con antígenos de BoHV y BVDV.

La hipótesis de este trabajo es que el cobayo es un buen modelo para predecir la respuesta humoral a BoHV en bovinos.

El objetivo de este trabajo fue estudiar un modelo en animales de laboratorio (cobayo) para evaluar la potencia a través del poder inmunogénico de BoHV-1 en una vacuna comercial inactivada, teniendo como indicador el título de anticuerpos neutralizantes inducido en bovinos y cobayos vacunados.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Animales

Se utilizaron treinta terneros de raza Hereford y cruza, de ambos sexos, entre 5 y 6 meses de edad, seronegativos para herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1). Seleccionados al azar se inmunizaron 20 animales y 10 sin vacunar (controles).

Del mismo modo, treinta y cinco cobayos (*Cavia Porcellus*) adultos, con peso aproximado de 500 gramos. Seleccionados al azar 25 cobayos fueron inmunizados y 10 no vacunados como control.

2.2. Vacuna utilizada

Se utilizó una vacuna comercial nacional destinada a bovinos para la prevención de enfermedades infecciosas que afectan la reproducción, conteniendo antígenos de BoHV-1 y 5, Virus de Diarrea Viral

Bovina tipo I (BVDV-I), 7 serovares de *Leptospira interrogans* y *Campylobacter fetus*, selenio (Se) e hidróxido de aluminio/saponina como adyuvante.

2.3. Protocolo de vacunación y toma de muestras

La vacunación en bovinos se realizó con 5ml (recomendación del fabricante) por vía subcutánea, administrándose una dosis inicial (día 0), y una revacunación (día 21).

La toma de muestra en bovinos se realizó por punción de la vena coccígea media, a los 0, 21, 35, 56, 98 y 133 días desde el inicio del ensayo (día 0).

Previo al uso de la vacuna en cobayos se removió el selenio, dado que en experimentos anteriores se encontró que es tóxico para esta especie. El selenio se extrajo mediante centrifugación, descarte de sobrenadante y re-suspensión al volumen inicial con solución salina. Se utilizó 1 ml (1/5 de la dosis bovina) inoculada en la zona inguinal por vía subcutánea. Se administró una dosis inicial (día 0) y un refuerzo (día 21). La extracción de sangre en cobayos se realizó por punción intra-cardíaca previa anestesia con xilacina (5 mg/kg) y ketamina (50 mg/kg), a los 0, 42, 56, 98 y 133 días desde el comienzo del ensayo (día 0).

Los bovinos y cobayos controles fueron inyectados con la misma dosis del vehículo utilizado en la vacuna sin antígenos.

2.4. Células y virus

La propagación viral y la técnica de Seroneutralización (SN) *in vitro* fueron realizadas en la línea *Madin Darby bovine kidney* (MDBK), American Type Culture Collection (ATCC), mantenidas con Minimum Essential Medium (MEM) y 10 % de suero fetal bovino (FCS) libres de *pestivirus*. La cepa de referencia Los Angeles (BoHV-1) fue utilizada como virus descarga en las pruebas de SN.

2.5. Seroneutralización (SN) *in vitro*

La prueba de SN *in vitro*, es la técnica patrón de la OIE para la detección de anticuerpos neutralizantes (Vallat, 2004), y fue la técnica serológica seleccionada para estudiar la inmunogenici-

dad del componente BoHV-1 de la vacuna en ambas especies. Las pruebas de SN se realizaron en micro-placas de 96 pocillos (Vallat, 2004), utilizando diluciones en base dos de los sueros previamente descomplementados a 56° C por 30 minutos. Se partió de diluciones 1:2 en bovinos y 1:4 en cobayos, hasta 1:256 en ambas especies y enfrentándolas a dosis constantes de virus equivalentes a 100 unidades infectantes de cultivo celular 50% (TCID₅₀/pocillo).

Los títulos de Acs neutralizantes se expresaron como el recíproco de la mayor dilución del suero capaz de inhibir el efecto citopático (CPE) del virus en el 50% de los pocillos.

2.6. Análisis estadístico

Se estudia la regresión del título sobre los días desde el inicio del ensayo (die) para cobayos y bovinos, mediante un modelo de regresión múltiple (Kleinbaum, 1978).

Dado que los títulos tienen valor 0 (el día inicial), que después crecen hasta alcanzar un máximo y que posteriormente decrecen asintóticamente hacia 0, se ensayó una función de regresión que cumple con estas condiciones: logaritmo de

$$t = a + b.\text{die} + c.\log(\text{die} + 1)$$

Donde:

«t» es el título observado en cobayos incrementado en una unidad.

«a, b y c» son parámetros a ser estimados.

«die» son los días post inicio del ensayo y los logaritmos son decimales.

Se calcularon para esta función los parámetros, sus significaciones a posteriori, sus errores de estimación, el coeficiente de determinación (R²), el error típico de estimación de log t (SE) y el estadístico de Durbin-Watson (DW) de independencia de los residuos.

A partir del modelo, se estimaron gráficamente, en forma aproximada, los días en que el título es máximo y en el que desciende por debajo de 8, título considerado como protector por el Código Federal de Regulación del USDA, 2008.

Se calcularon, utilizando el «modelo cobayo», los log t estimados para bovinos. Los valores de log t observados se pusieron en regresión lineal sobre los estima-

dos, con la finalidad de determinar la validez de la aplicación del modelo cobayo a la predicción de los valores en la especie bovina. De ser válido, la ordenada en el origen debería ser cercana a 0 (p-valor ≤ 0.05) y la pendiente próxima a 1 (p-valor ≤ 0.05).

El programa estadístico utilizado fue STATGRAPHICS PLUS V 5.1

3. RESULTADOS

Los resultados de los títulos de Acs neutralizantes observados en bovinos y cobayos están resumidos en el cuadro 1. Los títulos máximos de Acs neutralizantes se detectaron a los 35 días del inicio del ensayo en el 60% de los bovinos, siendo 256 el título máximo y la media geométrica (MG) de 117. En cobayos los títulos máximos se detectaron a los 56 días, siendo 128 el título máximo y la MG de 40.

En el cuadro 1, comparando las sangrías de los días 35 y 98 de bovinos y 42 y 98 de cobayos se observa una mayor variabilidad de los títulos de Acs neutralizantes en bovinos que en cobayos. En el cuadro 1 se puede observar que en los días 56 y 98 se sangraron la mitad de los bovinos en experimentación debido a problemas de manejo. También en los días 98 y 133 el número de cobayos en experimentación descendió debido a que murieron a causa de que la sangría intra-cardíaca es riesgosa.

Los títulos de Acs neutralizantes descendieron por debajo de 8, a los 133 días desde el comienzo del experimento, en ambas especies.

En cuanto a la regresión del Modelo Cobayo la ordenada en el origen (a) no difiere significativamente de 0 (estimación = 0.000459, error típico = 0.05323, p = 0.9931).

La estimación del coeficiente de días post inicio del experimento (die) (b) es -0.0156232, con un error típico de 0.0014923 y p = 0.0000.

La estimación del coeficiente de log (die+1) (c) es de -1.37147 con un error típico de 0.0626658 y p = 0.0000.

Del modelo cobayo se observa que la abscisa del título máximo es 35 die aproximadamente y la abscisa del título 8 es 120 die aproximadamente.

Cuadro 1. Título de Anticuerpos Neutralizantes anti-BoHV-1 de bovinos y cobayos determinados luego de la inmunización con una vacuna inactivada comercial polivalente.

DIA desde inicio ensayo (día 0) ³	21		35		56		98		133	
TÍTULO Acs	TI ¹	MG ²	TI	MG	TI	MG	TI	MG	TI	MG
BOVINOS (n=20)	32 (2) 24 (3) 16 (4) 12 (2) 8 (5) 6 (3) 4 (1)	11.99	256 (5) 192 (2) 128 (5) 96 (2) 64 (4) 48 (1) 24 (1)	117,42	256 (1) 192 (2) 48 (4) 24 (1) 16 (1) 12 (1)	54.5	32 (1) 24 (1) 16 (1) 12 (3) 8 (2) 6 (1) 4 (1)	11.3	16 (1) 8 (5) 4 (8) 2 (6)	4.14

DIA desde inicio ensayo (día 0) ³	42		56		98		133	
TÍTULO Acs	TI	MG	TI	MG	TI	MG	TI	MG
COBAYOS (n=25)	64 (8) 48 (1) 32 (9) 16 (5) 8 (1)	34.18	128 (7) 64 (4) 32 (6) 24 (1) 16 (5) 8 (2)	40.6	32 (3) 16 (10) 8 (7) 4 (1)	13.3	16 (3) 12 (1) 8 (4) 4 (3)	7.4

¹Título de Anticuerpos Neutralizantes (número de animales con el mismo resultado).

²Media geométrica de los títulos individuales.

³En día 0 en ambas especies no se detectaron anticuerpos neutralizantes.

El P del modelo cobayo es de 0.0000, R² = 84.67, SE = 0.2666311.

No existió autocorrelación entre los residuos, según el test de Durbin-Watson (DW) = 1.87535 con un p de 0.2599).

Todos los animales control de ambas especies dieron negativo en todas las sangrías.

Hay asociación aceptable entre los log t observados en bovinos con los estimados según el modelo cobayo (figura 1), dado que la ordenada en el origen no difiere significativamente de 0, (estimación = -0.0912928, error típico 0.0855935 y p-valor = 0.2890). La pendiente no difiere significativamente de 1 (estimación = 1.08059, error típico 0.0700064 y p-valor > 0.05).

Del modelo cobayo el p es de 0.0000, R² = 72.6, SE 0.40562.

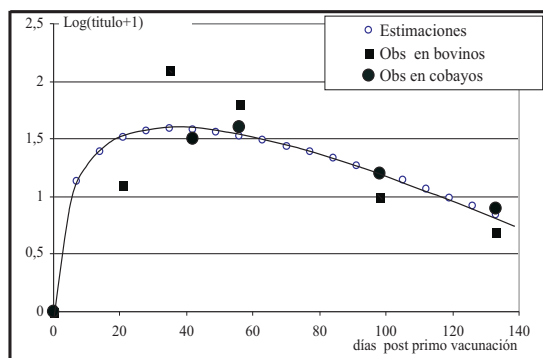


Figura 1. Títulos de anticuerpos neutralizantes anti-BoHV-1 observados y estimados a partir del modelo cobayo.

4. DISCUSIÓN

La validación de un modelo en animales de laboratorio para facilitar el control de las vacunas contra infecciones víricas, ha sido objeto de estudio en varios países de la región y del mundo (Hartman *et al.*,

1991; MacPhail *et al.*, 2004; Parreño *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2007b).

La utilización de estos modelos facilitaría el control durante el desarrollo de vacunas y la elaboración de políticas gubernamentales de control.

En este trabajo se evaluó un modelo cobayo para estudiar la inmunogenicidad componente del BoHV-1 de una vacuna inactivada, determinando la cinética de los títulos de Acs neutralizantes en bovinos y cobayos hasta más de 4 meses desde el inicio del ensayo.

En Brasil (Silva *et al.*, 2007b) han evaluado el mismo modelo pero los títulos se determinaron a tiempo fijo, a los 56 días del inicio de los ensayos, tanto en cobayos como en bovinos, sin estudiar la cinética de la respuesta inmune

humoral. Además en el presente trabajo los títulos de anticuerpos neutralizantes alcanzados por el 60% de los bovinos vacunados fueron superiores (128 a 256) a los observados por Silva *et al.*, 2007b. Estos autores observaron que el 80% de los bovinos alcanzaron únicamente títulos de entre 8 y 16. Si bien estos autores no especifican la concentración del virus de BoHV en la vacuna utilizada en bovinos, muy probablemente esta diferencia se puede deber a la diferente concentración del antígeno, como lo demuestran con los cobayos.

En el cuadro 1 se puede observar que en los días 56 y 98 se sangraron la mitad de los bovinos en experimentación debido a problemas de manejo. También en los días 98 y 133 el número de cobayos en experimentación descendió debido a que murieron durante la sangría. Por las razones expuestas y porque las medidas son repetidas sobre los mismos sujetos y como el diseño quedó incompleto (hay datos faltantes) y descompensado (hay fechas de observación no coincidentes) se realizó el test de Durbin-Watson para ver si había auto correlación en los residuos. Dicho test demostró que no existió auto correlación, $DW = 1.87535$ con un p de 0.2599.

Si bien los errores de estimación de los títulos para bovinos a partir del modelo cobayo son relativamente grandes, las abscisas (die) del mismo y del título 8 de las observaciones y de las estimaciones coinciden muy aproximadamente.

En nuestro trabajo los títulos máximos de Acs neutralizantes reales observados para cada especie y los estimados para bovinos a partir de la regresión de cobayos coincidieron en 35 días para

bovinos con GM de 117 y en cobayos a los 56 días con GM de 40.6. Por lo tanto, podemos validar un modelo en el que los títulos máximos en cobayos se alcanzan 21 días después que en bovinos, lo cual debería tenerse en cuenta para determinar el día de sangría durante la evaluación de la vacuna si se quiere utilizar un solo día de sangría.

Los días en que se encontraron los títulos máximos de Acs neutralizantes en bovinos (35 días) coinciden con lo indicado para bovinos por el CFR (CFR, 2008). Esta regulación recomienda sangrar a los animales vacunados a los 14 días post revacunación, que corresponde a 35 días post inicio del experimento, debiéndose alcanzar en el 80% de los animales vacunados un título de Acs neutralizantes de 8 o mayor. Los resultados obtenidos en este estudio para bovinos demuestran que la vacuna ensayada induce títulos de Acs superiores a los requeridos por el CFR 2008 y los encontrados por otros autores (Silva *et al.*, 2007b).

También se determinó que a los 133 días los títulos descienden por debajo de ocho en ambas especies, lo que indica que los títulos de Acs decaen en forma pronunciada y refuerza la hipótesis de revacunar cuando sea necesario incrementar la respuesta inmune humoral.

A su vez estos resultados demuestran que la cinética de la respuesta inmune puede brindar más información que una sangría a tiempo fijo.

La concentración de selenio (Se) que posee la formulación de la vacuna para bovinos es letal si se administra vía oral en cobayos (Town, 2004). Experimentos anteriores realizados en nuestro laboratorio mostraron que esa concentra-

ción de Se vía subcutánea también es tóxica para cobayos. Por esta razón el Se fue extraído de la formulación previo a la vacunación de esta especie y el protocolo de remoción utilizado no afectó la inmunogenicidad de la vacuna dado que se obtuvieron títulos superiores a los obtenidos por otros autores (Silva *et al.*, 2007b).

El modelo cobayo para estudiar la inmunogenicidad de este tipo de vacunas comerciales es un desafío que a nivel regional ya ha comenzado a imponerse.

Para que este modelo pueda ser utilizado más ampliamente como herramienta alternativa más económica a las pruebas en bovinos, se deberían probar más vacunas, incluyendo diferentes lotes y diferentes marcas.

5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio aportan evidencias de que el modelo cobayo se podría utilizar para evaluar la inmunogenicidad del componente BoHV-1 de vacunas virales inactivadas bovinas, dado que existió una asociación aceptable entre los logaritmos de títulos observados en bovinos con los estimados según el modelo cobayo.

Los resultados obtenidos en este estudio para bovinos demuestran que la vacuna ensayada induce títulos de Acs superiores a los requeridos por el CFR y los encontrados por otros autores.

Al estudiar la respuesta inmune humoral, se observó cuando se llega a los títulos máximos y cuando éstos descienden por debajo del título protector.

6. Agradecimientos

A Laboratorios Santa Elena por el apoyo económico para poder realizar estos estudios.

7. Referencias bibliográficas

- Ackermann, M.; Engels, M.** (2006). Pro and contra IBR-eradication. *Vet Microbiol* 113:293-302.
- Alonzo, P.; Benavides, U.; Isnardi, F.; Puentes, R.; Carol, H.; Clavijo, A.; del Campo, R.; Bonnevaux, J.; Weiblen, R.; Fondevila, N.; Romera, S.; Sadir, A.; Maisonnave, J.** (2002). Caracterización de un herpesvirus 1.1 (HVB-1.1), aislado de un bovino con signos nerviosos y sin respuesta inmune humoral específica. *Veterinaria (Montevideo)* 37:15-22.
- Baba, K.; Shiraki, K.; Kanesaki, T.; Yamanishi, K.; Ogra, P.L.; Yabuuchi, H.; Takahashi, M.** (1987). Specificity of skin test with varicella-zoster virus antigen in varicella-zoster and herpes simplex virus infections. *J Clin Microbiol* 25:2193-6.
- Babiuk, L.; van Drunen Littell, S.; Tikoo, S.** (1996). Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. *Vet Microbiol* 53:31-42.
- Baker, J.C.** (1995). Clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. *Veterinary Clinics of North America* 11:425-445.
- CFR.** (2008). Code of Federal Regulations - USDA:113.216.
- D'Arce, R.C.; Almeida, R.S.; Silva, T.C.; Franco, A.C.; Spilki, F.; Roche, P.M.; Arns, C.W.** (2002). Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. *Vet Microbiol* 88:315-24.
- DesCoteaux, L.; Cecyre, D.; Elsener, J.; Beauchamp, G.** (2003). Comparison of humoral immune responses in dairy heifers vaccinated with 3 different commercial vaccines against bovine viral diarrhoea virus and bovine herpesvirus-1. *Can Vet J* 44:816-21.
- Donofrio, G.; Cavirani, S.; Vanderplasschen, A.; Gillet, L.; Flammini, C.F.** (2006). Recombinant bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) expressing glycoprotein D of BoHV-1 is immunogenic and elicits serum-neutralizing antibodies against BoHV-1 in a rabbit model. *Clin Vaccine Immunol* 13:1246-54.
- Edwards, S.; Woods, S.B.; Westcott, D.G.; Emmerson, M.; Jones, P.C.; Phillips, A.J.** (1986). An evaluation of five serological tests for the detection of antibody to bovine herpesvirus 1 in vaccinated and experimentally infected cattle. *Res Vet Sci* 41:378-82.
- Fulton, R.W.; Confer, A.W.; Burge, L.J.; Perino, L.J.; d'Offay, J.M.; Payton, M.E.; Mock, R.E.** (1995). Antibody responses by cattle after vaccination with commercial viral vaccines containing bovine herpesvirus-1, bovine viral diarrhoea virus, parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus immunogens and subsequent revaccination at day 140. *Vaccine* 13:725-33.
- Goddard, R.D.; Hopkins, I.G.; Thornton, D.H.** (1986). The development of a potency test for *Leptospira hardjo* vaccines: a comparison of protection in calves and serology in guinea-pigs. *J Biol Stand* 14:337-44.
- Guarino, H.; Maisonnave, J.; Capano, F.; Pereira, J.** (1982) Primer aislamiento e identificación del virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)* 83:131-134.
- Hartman, A.B.; Powell, C.J.; Schultz, C.L.; Oaks, E.V.; Eckels, K.H.** (1991). Small-Animal Model To Measure Efficacy and Immunogenicity of Shigella Vaccine Strains. *INFECTION AND IMMUNITY* 59:4075-4083.
- Karhs, R.** (1987). Infectious Bovine Rhinotracheitis: A Review and Update. *JAVMA* 171:1055-1064.
- Kleinbaum, D.G.a.K. L.L.** (1978). Applied Regression Analysis and other Multivariable Methods PWS, Boston Massachusetts.
- MacPhail, M.; Schickli, J.H.; Tang, R.S.; Kaur, J.; Robinson, C.; Fouchier, R.A.; Osterhaus, A.D.; Spaete, R.R.; Haller, A.A.** (2004). Identification of small-animal and primate models for evaluation of vaccine candidates for human metapneumovirus (hMPV) and implications for hMPV vaccine design. *J Gen Virol* 85:1655-63.
- Meeusen, E.N.T.; Walker, J.; Peters, A.; Pastoret, P. P.; Jungersen, G.** (2007). Current Status of Veterinary Vaccines. *Clin. Microbiol. Rev.* 20:489-510. DOI: 10.1128/cmr.00005-07.
- Metzler, A.E.; Matile, H.; Gassmann, U.; Engels, M.; Wyler, R.** (1985). European isolates of bovine herpesvirus 1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides, and reactivity with monoclonal antibodies. *Arch Virol* 85:57-69.
- Miller, J.; Whetstone, C.; Maaten, M.V.d.** (1991). Abortifacient property of bovine herpesvirus type 1 isolates that represent three subtypes determined by restriction endonuclease analysis of viral DNA. *Am J Vet Res* 52:458-61.
- Miller, N.J.** (1955). Infectious necrotic rhinotracheitis of cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 126:463-467.
- Parreño, V.; D'Amico, N.; Garaicoechea, L.; Vena, M.; Izuel, M.; Fillipi, J.; Bellinzoni, R.; Maliandi, F.; Bardón, J.; Combessies, G.; Fernández, F.** (2004). Desarrollo de un modelo cobayo aplicado al control de calidad inmunogénica de vacunas virales bovinas: resultados preliminares, XIX Panamericano de Ciencias Veterinarias, Sheraton Hotel, Bs. As. Argentina.
- Patel, J.R.** (2005). Relative efficacy of inactivated bovine herpesvirus-1 (BHV-1) vaccines. *Vaccine* 23:4054-61. DOI: S0264-410X(04)00955-7 [pii] 10.1016/j.vaccine.2004.12.010.
- Pidone, C.L.; Galosi, C.M.; Echeverría, M.G.; Nosetto, E.O.; Etcheverrigaray, M.E.** (1999). Restriction endonuclease analysis of BHV-1 and BHV-5 strains isolated in Argentina. *Zentralbl Veterinarmed B* 46:453-6.
- Pospisil, Z.; Krejci, J.; Jinek, P.; Lany, P.; Zendulkova, D.; Cihal, P.** (1996). Development of a disease control programme based on the use of an inactivated vaccine against infectious bovine rhinotracheitis. *Vet Microbiol* 53:199-206.
- Puentes, R.; Alonzo, P.; Benavides, U.; Silva, A.D.; Esteves, P.A.; Roche, P.M.; Maisonnave, J.** (2007). Primer

- aislamiento de Herpesvirus Bovino 1 Subtipo 2 (BoHV-1.2) en Uruguay. *Veterinaria* (Montevideo) 42:9-13.
- Repiso, M.V.; Gil, A.; Bañales, P.; D' Anatro, N.; Fernández, L.; Guarino, H.; Herrera, B.; Núñez, A.; Olivera, M.; Osawa, T.; Silva, M.** (2005). Prevalencia de las principales enfermedades infecciosas que afectan el comportamiento reproductivo en la ganadería de carne y caracterización de los establecimientos de cría del Uruguay. *Veterinaria* (Montevideo) 40:5-28.
- Roizmann, B.; Desrosiers, R.C.; Fleckenstein, B.; López, C.; Minson, A.C.; Studdert, M.J.** (1992). The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol* 123:425-49.
- Saizar, J.** (1997). Determinación de la prevalencia de la Rinotraqueítis Bovina Infecciosa - IBR en rodeos de leche y carne en Uruguay. *Veterinaria* (Montevideo) 133:4-7.
- Schleiss, M.R.** (2008). Comparison of vaccine strategies against congenital CMV infection in the guinea pig model. *J Clin Virol.* in press.
- Schwzyer, M.; Ackermann, M.** (1996). Molecular virology of ruminant herpesviruses. *Vet Microbiol* 53:17-29.
- Silva, L.; Weiblen, R.; Flores, E.** (2007a). Imunogenicidade de vacinas comerciais inativadas contra o herpesvírus bovino tipo 1. *Ciência Rural, Santa Maria* 37:1471-1474.
- Silva, L.F.; Diel, D.G.; do Carmo Clento, M., Weiblen, R.** (2007b). Guinea pigs as a model test of bovine herpesvirus type 1 and bovine viral diarrhea virus inactivated vaccines. *Ciencia Rural* 37:1060-1065.
- Smee, D.F.; Leonhardt, J.A.** (1994). Vaccination against bovine herpes mammillitis virus infections in guinea pigs. *Intervirology* 37:20-4.
- Tikoo, S.; Campos, M.; Babiuk, L.** (1995). Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis, and control. *Adv Virus Res* 45:191-223.
- Town, W.G.** (2004). The Merck index 13.2 CD-ROM edition from CambridgeSoft. *J Chem Inf Comput Sci* 44:1883-5. DOI: 10.1021/ci0400462.
- Vallat, B.** (2004). Infectious Bovine Rhinotracheitis/Infectious Pustular Vulvovaginitis, Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals O.I.E. pp. 514-526.
- Van Donkersgoed, J.; Van den hurk, J.; Mc Cartney, D.; Harland, R.** (1991). Comparative serological responses in calves to eight commercial vaccines against infectious bovine rhinotracheitis, parainfluenza 3, bovine respiratory syncytial, and bovine viral diarrhea viruses. *Can Vet J* 32. :727-733.
- Yao, Q.; Qian, P.; Huang, Q.; Cao, Y.; Chen, H.** (2008). Comparison of immune responses to different foot-and-mouth disease genetically engineered vaccines in guinea pigs. *J Virol Methods* in press.