

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

XXI Seminario sobre Armonización del Registro y Control de Medicamentos Veterinarios

Comité de las Américas de Medicamentos Veterinarios (CAMEVET)

La Antigua Guatemala, Guatemala

9 al 13 de noviembre de 2015

### *Discursos de apertura*

El Sr Leonel Rodas Serrano, vicepresidente del Comité Organizador, dio la bienvenida a los participantes, junto a la Dra. Elisabeth Erlacher, Jefa adjunta del Departamento Científico y Técnico de la OIE, el Dr. Martín Minassian, Asistente Técnico de la Representación Regional de la OIE para las Américas, el Dr. Enrique Argento, Secretario del CAMEVET, y la Dra. María Eugenia Paz, Presidenta del Comité y Punto Focal de la OIE para los Productos Veterinarios.

El Dr. Minassian destacó la importancia de los productos veterinarios, y la prioridad que la OIE da al tema de los antimicrobianos y su resistencia.

El Sr. Rodas Serrano agradeció la colaboración recibida de parte de la Mesa Ejecutiva y de las empresas patrocinantes.

La Dra. María Eugenia Paz expresó su cálida bienvenida a los participantes, destacando la importancia que tiene este evento para su país y toda la región.

El Dr. Enrique Argento agradeció el esfuerzo realizado durante el año por el Comité Organizador, reconociendo que fue un año complejo para el país sede.

### *Asunción de Presidencia*

La Dra. María Eugenia Paz asumió la Presidencia del Seminario.

### **Sesión I – Relaciones del CAMEVET**

#### **Aplicación de los documentos armonizados por el Comité**

*Procedimientos para la participación de CAMEVET en las propuestas para la creación y modificación de los estándares de la OIE.*

*Normas en actual revisión.*

El Dr. Martín Minassian, Asistente Técnico de la Representación Regional de la OIE para las Américas, realizó una presentación que incluyó la descripción de la estructura de la OIE, incluyendo a los cargos renovados durante el año 2015.

Asimismo, realizó una descripción de los Códigos de la OIE, detallando las funciones de las Comisiones Especializadas y su cronograma anual de trabajo, planteando las instancias en las que los Países Miembros de la OIE tienen la oportunidad de emitir comentarios y proponer modificaciones.

Incluyó en la presentación a una selección de las Resoluciones adoptadas durante la 83ª Sesión General de la OIE con impacto en las actividades del CAMEVET, incluyendo a la Resolución N° 26, dirigida a reducir la resistencia a los antimicrobianos, así como las modificaciones en los Códigos y Manuales, y la aprobación de un kit de diagnóstico.

Finalmente, detalló los Capítulos del Código Sanitario para los Animales Terrestres en actual

revisión y con plazo para la emisión de comentarios hasta el día 8 de enero de 2016, instando a los Puntos Focales a trabajar en línea con sus Delegados y conjuntamente con el sector privado en este proceso.

### *Estado de implementación de los documentos armonizados en los países miembros.*

El Dr. Enrique Argento presentó los resultados de una encuesta enviada a los países de las Américas, que reflejó el estado de implementación de los documentos armonizados. Recordó la necesidad de contar con las respuestas de los países, ya que esta encuesta permite conocer el impacto del trabajo del Comité.

Se destacó que si bien en muchos casos los documentos armonizados no son incorporados en las reglamentaciones nacionales, son utilizados como un sustento técnico, o son aplicados sin incorporarlos a las reglamentaciones, por lo que es importante contar con dicha información. Para ello, se recordó el criterio, propuesto en el anterior Seminario, del uso referencial de los documentos armonizados, dejando de lado el concepto de internalización. Se destacó que la presentación se entregará a los presentes con el objeto que sirva para conocer el estado en cada uno de los países. Se propuso que esta encuesta sea completada por los países que no respondieron, o que fuera actualizada si correspondiera.

### *Participación del CAMEVET en el Foro de divulgación de VICH*

El Dr. Enrique Argento realizó una presentación relativa a su participación en representación del Comité, revisando el historial de las reuniones de este de Foro, e informó lo ocurrido en las reuniones de febrero de 2015 en realizada en Washington y octubre de 2015 en Tokio. Destacó la importancia de la participación de los representantes de los países del continente americano en las reuniones, así como la participación del CAMEVET en el Grupo de Trabajo de modificación de la Guía de Estabilidad de VICH de Principios Activos y Productos Farmacéuticos Veterinarios en relación con las zonas climáticas 3 y 4.

Se destacó el haber asegurado la participación de la industria en el Foro, y se informó la participación del CAMEVET y de las delegaciones oficial y privada de Argentina en los Talleres referidos a bioequivalencia y capacitación.

Se mencionó que los temas que se consideraron prioritarios por parte de la mayoría de los participantes del Foro, y surgidos de los talleres realizados en la reunión de Tokio fueron el de farmacovigilancia y, a propuesta de Argentina, de resistencia a los antiparasitarios como nuevo tema a desarrollar.

Se expusieron las presentaciones que se realizaron en ambos eventos, destacándose:

De la reunión realizada en Washington:

La encuesta realizada entre los países miembros de CAMEVET. Al respecto se mencionó el pobre número de respuestas obtenido y que esto reducía el valor de las conclusiones.

La comparación entre algunas Guías de VICH y sus homólogas del CAMEVET, mencionándose su alto grado de similitud.

De la reunión realizada en Tokio:

La utilización de las Guías de VICH por parte de los países miembros y de los integrantes del Foro, presentación que será distribuida a los participantes con el objeto de informar sobre estos usos.

Es importante destacar la conveniencia de insistir sobre la posibilidad de definir un criterio de equivalencia entre guías homólogas. Se trata de demostrar que, si bien los documentos no son idénticos, son equivalentes en su sustento científico.

Se recibieron comentarios del sector oficial de Brasil, en cuanto a que se están utilizando

las Guías del VICH, y consideró que son importantes para el comercio internacional de productos veterinarios.

El sector oficial expresó la conveniencia de ampliar la participación de los países de la región en el Outreach Forum del VICH. Se aclaró que esta decisión no depende del CAMEVET sino del Steering Committee del VICH.

Se recordó que son condiciones para la participación en el VICH el asumir todos los costos de participación, así como el compromiso de participación continuada y continuidad de los representantes.

La Dra. Silvia Piñeiro (FDA – USA) Explicó la forma de trabajo del VICH, y destacó las distintas formas de participar en la generación y actualización de las Guías.

Manifestó que el uso que se le da a las guías es a título de sugerencia para la correcta confección de los protocolos para el registro de productos.

Informó también que la FDA está traduciendo las Guías VICH al idioma castellano, y que ya se tradujeron 5, y otras 5 traducciones están por ser finalizadas. Agregó que las traducciones definitivas están disponibles en la Web de FDA, y ofreció compartir los borradores de trabajo.

El Dr. Argento informó acerca de la reiteración de la invitación realizada por Estados Unidos de América para realizar la reunión del Steering Committee y del Outreach Forum en Buenos Aires en febrero de 2017. Comentó que la Mesa Ejecutiva aprobó esta propuesta por considerarla muy importante para la región. Finalmente, puntualizó que el Steering Committee formalizó la propuesta.

#### *Conclusiones de la reunión plenaria del sector oficial*

La Dra. Gloria Alarcón, Punto Focal de la OIE para los Productos Veterinarios por Paraguay, presentó las conclusiones de esta reunión.

El documento final de la reunión se incluye como **Anexo**.

A partir de la presentación, el representante de CLAMEVET propuso la incorporación del punto relativo a la información para el adecuado descarte de productos en el rotulado en el correspondiente documento armonizado. Esta actividad será asumida por el grupo de trabajo que está analizando actualmente la Guía de Rotulado, que se halla en revisión.

#### *Conclusiones de la Reunión plenaria del sector privado.*

Se informó sobre los temas tratados durante la reunión del sector privado.

El documento final de la reunión se incluye como **Anexo**.

#### *Temas Prioritarios de CAMEVET- Resistencia a los Antimicrobianos*

Se realizó una mesa redonda en la cual participaron el Dr. Minassian, el Dr. César Díaz, Coordinador de Registro de Productos Veterinarios del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) de Argentina, y el Dr. Horrys Friaça, Especialista en Sanidad Agropecuaria e inocuidad de Alimentos del Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA).

El Dr. Minassian describió el primer borrador de trabajo del plan estratégico de implementación de las normas de la OIE sobre resistencia a los antimicrobianos para las Américas. Este plan se compone de tres etapas, que incluyen la de obtención de información de los

países de la región, la definición de las brechas, y el desarrollo de un plan de acción para cubrir estas brechas.

Para la primera etapa, se realizará una consulta electrónica, y a partir de estos datos se proseguirá con las siguientes etapas, con miras a presentar los resultados en la próxima Conferencia de la Comisión Regional de la OIE para las Américas, en noviembre de 2016.

El Dr. César Díaz informó sobre el desarrollo del plan nacional de control de la resistencia a los antimicrobianos, con un trabajo en conjunto entre el Ministerio de Agricultura y el Ministerio de Salud sobre el tema, y comentó que el SENASA realizará acciones de muestreo y aislamientos en frigoríficos de bovinos, cerdos y aves.

El Dr. Horrys Friaça describió al plan de capacitación sobre resistencia y buen uso de medicamentos veterinarios llevado a cabo por el IICA.

El representante de CAPROVE apoyó estas propuestas, comentando que se debe tender al uso responsable de los medicamentos y no su prohibición, y que todas las medidas que se tomen en este sentido sean basadas en la ciencia. Asimismo, recordó acerca de la guía de Buenas Prácticas de Uso de productos veterinarios adoptada en el año 2005.

## **SESION II Documentos de trabajo**

### ***Guía para el registro de medicamentos homeopáticos veterinarios***

La representación de SINDAN, como coordinador del grupo de trabajo, realizó una presentación, a través del Dr. Mario Real, experto en el tema.

Ante la manifestación del sector oficial de Brasil en cuanto a la existencia de diferencias de criterio, se decidió regresar el tema al grupo de trabajo para su consideración por vía electrónica, manteniéndose en el status de Trámite II.

### ***Guía para el registro de productos veterinarios nutracéuticos /Complementos dietarios***

El Dr. Carlos Rufrano, coordinador del Grupo de Trabajo, presentó la versión final del Documento, aprobándose por unanimidad. El Documento se incluye como **Anexo**.

### ***Guía de Pruebas de Potencia para vacunas inactivadas que contienen virus PI3, modelo cobayo.***

La Dra. Viviana Parreño, coordinadora del Grupo de Trabajo, realizó la presentación del documento final, en trámite IV. Habiendo cumplido con todos los requisitos se propuso la aprobación del documento.

Se recibieron comentarios por parte del Dr. Carlos Francia (CAPROVE) quien aclaró que las Guías son referencias y no de aplicación mandatoria. Asimismo, el Dr. Ricardo Rego Pamplona (MAPA Brasil) indicó que se pueden aplicar otras técnicas alternativas a las Guías, consensuadas con el órgano de registro.

No habiendo oposición, se aprobó el documento en forma unánime, el cual se adjunta como **Anexo**

### ***Guía de Buenas Prácticas de Almacenamiento, Distribución y Transporte de Productos Veterinarios***

El Dr Carlos Rufrano, Coordinador del Grupo de Trabajo, presentó el estado de avance del documento, destacando que se recibieron algunos comentarios que ya se incluyeron en la

versión castellana y faltan ser agregadas en las traducciones al inglés y portugués. Hecho esto, se circulará a través de la Secretaría a todos los miembros del CAMEVET y, si no hay objeciones, en un plazo de 60 días, se informará a la Secretaría, quien solicitará al sector oficial la conformidad para su aprobación. El sector oficial presentó conformidad a la aprobación mediante este procedimiento, comprometiéndose al envío de un correo electrónico de confirmación.

### ***Consideraciones para la regulación de las vacunas para la acuicultura en las Americas***

El Dr. Glen Gifford, Coordinador del Grupo de Trabajo, realizó la presentación del primer borrador del documento, el cual se encuentra pendiente de su traducción al portugués. El Dr. Carlos Francia destacó la innovación propuesta por el Dr Gifford respecto al reconocimiento y consulta del organismo regulatorio a otros organismos con incumbencia y mayor experiencia en el tema. El Grupo de Trabajo continuará elaborando el borrador iniciado, actualmente en estado de Trámite II. Dicho borrador será distribuido para comentarios en cuanto el grupo de trabajo finalice la revisión de las versiones traducidas, y será presentado en el próximo Seminario.

### ***Seguridad de vacunas en bovinos – Guía para estudios con vacunas inactivadas.***

La Dra María Marta Vena, coordinadora del Grupo de Trabajo, realizó la presentación del documento final, en estado de trámite IV. Habiendo cumplido con todos los requisitos, se propuso la aprobación del documento. Se aprobó el documento, que se adjunta como **Anexo**, por unanimidad.

### ***Guía para Pruebas de Potencia para vacunas inactivadas que contengan rotavirus bovinos***

La Dra Viviana Parreño, coordinadora del Grupo de Trabajo, realizó la presentación del documento final, en estado de trámite IV. Habiendo cumplido con todos los requisitos se propuso la aprobación del documento. El Dr. Ricardo Rego Pamplona (MAPA – Brasil) informó que Brasil no puede asumir la responsabilidad de proveer sueros estándar. Se aprobó el documento, que se adjunta como **Anexo**, por unanimidad.

### ***Guía de Bioequivalencia***

El Dr. Carlos Francia, Coordinador del Grupo de Trabajo, realizó la presentación de los avances en el documento referido. Destacó la excelente labor del Grupo y su elevado nivel técnico. Manifestó que durante el Seminario se realizó una reunión presencial, donde se pudieron acordar algunos puntos en conflicto. En función de esto se sugirió contar con un espacio en la Agenda del próximo Seminario para este tipo de reuniones. Se recibieron comentarios de sector oficial de Brasil respecto a la posibilidad de extrapolar resultados entre distintas especies animales. Se respondió que esta Guía no prevé esta posibilidad. Ante la pregunta de Ricardo Hoigjelle, representante de la Cámara de Industrias de Nicaragua, sobre las fechas de distribución de los documentos se invitó a esta Institución a integrarse al Grupo de Trabajo. El grupo de Trabajo continuará elaborando el borrador disponible, en estado de Trámite II,

para circular una versión a los países en el curso del próximo año. Finalmente, el Dr. Argento destacó el alto nivel técnico de los documentos presentados, la eficacia de los Grupos de Trabajo en el cumplimiento de los plazos preestablecidos y recordó el objetivo principal del CAMEVET que es la generación y armonización de recomendaciones basadas en principios científicos reconocidos.

***Instructivo para el llenado de formularios CAMEVET para el registro de productos farmacológicos y Biológicos.***

El Dr. César Díaz realizó la presentación del documento generado por el Grupo de Trabajo. Explicó que hubo dos tendencias, una tratando de agregar el máximo detalle posible y otra buscando presentaciones más generales. Esta divergencia de opiniones se resolvió en una reunión presencial con los integrantes del Grupo de Trabajo. Se continuará trabajando para concluir la guía propuesta, actualmente en estado de trámite II.

***Rotulado de Productos Veterinarios***

El Dr. Niels Scherling, de CAPROVE, Argentina, presentó los resultados de la encuesta realizada respecto a la terminología utilizada en los distintos países. Se hizo un análisis de las posibilidades de coincidencia en lo que se refiere a frases de inclusión obligatoria. Se halló que podría simplificarse el rotulado utilizando frases que son aceptadas en la mayoría de los países de la región. Se decidió continuar trabajando, para lo cual es necesario poner en revisión la Guía CAMEVET Rot 001 Rotulado de Productos Veterinarios, incluyendo también la Rot 002 Acuerdo de Sinonimia. Este Grupo también incluirá las recomendaciones de descarte de envases en el rotulado.

***Política de Genéricos – Criterios de aplicación de las definiciones para el registro de producto innovador, genérico, similar y nuevo.***

La Dra. Ofelia Flores, Punto Focal de México, realizó una presentación que incluyó las definiciones de cada tipo de producto. Se planteó la modalidad de registro en los países de Latinoamérica, en donde los productos a registrar se clasifican como innovadores, genéricos nuevos o genéricos intercambiables, versus la modalidad que permite el registro del producto innovador y luego el registro de productos genéricos tomando como referencia al innovador con estudios de bioequivalencia. La Dra. Flores destacó que debemos tomar en cuenta que existen dos posibilidades. Una sería la modificación de la modalidad de registro por la cual todos los productos genéricos deberían ser intercambiables, aceptando el uso de la bioequivalencia, o mantener el actual sistema. Para evaluar esta situación, la Dra. Flores propuso la realización de una encuesta para que los países emitan su opinión y envíen la legislación actualmente vigente referida a este tema. El Dr. Fernando Zambrano, del sector oficial de Chile, propuso el uso de Guías internacionales. El Dr. Javier Carracedo, de ALANAC, Brasil, propuso aportar la legislación brasilera sobre genéricos. Se decidió realizar una encuesta, cuyo contenido coordinará la Dra. Ofelia Flores. Para ello,

se fusionarán los dos Grupos que actualmente trabajan sobre el tema y se incluirá al Grupo de Trabajo de Bioequivalencia, actualmente en funcionamiento. Se continuará trabajando el tema, actualmente en estado de trámite I.

### *Promotores de Crecimiento*

La Dra. Laura Lorenzetti Jorge (SINDAN – Brasil) presentó el documento sobre promotores de crecimiento y aditivos alimentarios. Presentó al Dr. Richard Coulter, experto en promotores de crecimiento (Phibro Animal Health), quien hizo una presentación sobre los antimicrobianos y su uso como promotores de crecimiento.

A partir de la discusión, se decidió que se continuará elaborando el documento de trabajo, actualmente en estado de trámite II.

A partir de una sugerencia del Sr. Milson da Silva Pereyra, el Dr. César Díaz, representante de SENASA Argentina, informó que ese organismo está trabajando sobre estos productos con un sistema de trazabilidad desde 2013.

El Dr. G. Ardiles (ANVET – Chile) propuso incorporar a otros principios activos con efecto como promotores de crecimiento, tales como los extractos vegetales en los alcances del documento, lo cual fue aceptado.

### *Piratería y falsificación de productos veterinarios*

El Dr. Javier Carracedo (ALANAC – Brasil) presentó al programa de control de piratería y falsificación de productos veterinarios que se está implementando en Brasil, con la colaboración de varios organismos gubernamentales.

### *Mesa Redonda y Discusión – Presente y Futuro de CAMEVET*

#### **Plan Estratégico de CAMEVET**

El Dr. Carlos Francia, en representación del Dr. Federico Luna, Punto Focal de Argentina, presentó el Plan Estratégico CAMEVET 2015 – 2020. Comentó el modo en que trabajó el grupo que lo elaboró sobre las propuestas recibidas de los países.

El nuevo plan incluye la continuidad de algunos objetivos del plan anterior como capacitación y comunicación, y objetivos nuevos como farmacovigilancia y buen uso de medicamentos veterinarios.

Ante la escasez de opiniones recabadas, la Secretaría se hará cargo de una nueva circulación del documento, dando 60 días para la recepción de comentarios, y una nueva circulación.

#### **Curso de capacitación del CAMEVET**

La Dra. Liliana Revolledo presentó los avances del Plan de Capacitación. Informó que se ha elaborado un programa completo con la colaboración de los Dres. Adela Encinosa y Emilio Gimeno. El próximo paso es elaborar seis módulos piloto, los que estarían disponibles para Julio de 2016. Luego del lanzamiento de los módulos se recibirán comentarios y sugerencias para continuar avanzando con los definitivos, que serían lanzados en 2017.

#### **Comunicación**

En función de los pedidos de mayor conocimiento sobre el CAMEVET hechos por los representantes de la industria de Centroamérica, la Dra. Ofelia Flores propuso, a semejanza de lo que se hace en la OIE, se dicte una breve inducción al inicio de cada Seminario. Se sugirió la lectura de los documentos del CAMEVET, actualmente disponibles en la web. Se

aprobó la moción presentada por la Dra. Flores.

La Srta. Ana Sgammini, asistente de la Secretaría del CAMEVET, presentó la nueva página web <http://www.rr-americas.oie.int>

Se comunicó que el diseño y el contenido de la misma queda abierto a las sugerencias de los integrantes del Comité. Las propuestas serán recibidas por Secretaría.

La Dra Suzan McLennon, representante oficial de Jamaica, sugirió la inclusión en la página web de mensajes informativos a modo de flashes o banners. También requirió la posibilidad de incluir en cada documento una sección abierta a comentarios, tal como lo hace la FDA. La Mesa Ejecutiva evaluará las posibilidades de acuerdo a las disposiciones de la OIE.

### ***GS1 - Alcances en la estandarización de los sistemas de codificación y sus implicancias en la Industria de los Productos Veterinarios.***

El Dr. Mario Chávez Bocanegra, director de tecnología de la información de GS1 Guatemala, realizó la presentación, explicando qué es GS1, cuál es su organización y actividades. Describió la aplicación actual del sistema de trazabilidad en Argentina, para fármacos veterinarios y agroquímicos, como un ejemplo de las posibilidades de utilización.

El Dr. César Díaz, de SENASA Argentina, agregó cuáles son los alcances del sistema implementado, que incluye a los productos conteniendo ketamina, promotores de crecimiento y estradiol. Sugirió hacer una presentación específica en el próximo Seminario.

El Dr. Carlos Francia, de CAPROVE Argentina, opinó que el sistema de trazabilidad por unidad, es complicado y sólo se justifica para casos especiales como el de la ketamina, por los desvíos de uso. Por otra parte, el sistema de trazabilidad por lote es sencillo y fácil de implementar.

El Dr. Carlos Rufrano, de CLAMEVET Argentina, agregó que a partir de la implementación de la norma de GMP en Argentina ya se utiliza un sistema de trazabilidad a través de documentación comercial, y que el sistema GS1 sería un complemento.

El Dr. Martín Minassian indicó que OIE ha firmado un memorándum de entendimiento con GS1 para compartir estándares.

### ***Guía para el Registro de Kits de Diagnóstico para enfermedades.***

Dado que el Dr. Byron Rippke no pudo asistir, el Dr. Emigdio Lemes, hizo una presentación de los avances en este documento de trabajo.

El Dr. Lemes comunicó que se recibió el primer borrador en inglés y se hizo una traducción al español, que se remitió a la Secretaría, y sugirió hacer la traducción al portugués y circularlo. A tal efecto, SINDAN ofreció los servicios de traducción del documento.

El Dr. Martín Minassian indicó que el documento debe alinearse a las normas de la OIE, así como al procedimiento estándar de la OIE para el registro de los kits de diagnóstico.

Este documento se mantiene en estado de trámite II.

### ***Propuesta de nuevos temas***

#### ***Farmacovigilancia***

El Grupo de Trabajo será coordinado por ANVET (Chile), con la participación de los representantes oficiales de Argentina, Canadá, Chile, Costa Rica, Guatemala, México y Uruguay, así como CAPROVE y CLAMEVET (Argentina), ALANAC y SINDAN (Brasil), ASIFAN y Cámara de Insumos Agropecuarios (Costa Rica), INFARVET-CANIFARMA (México), CADIN (Nicaragua), ADIPRAVE y CEV (Uruguay).



### ***Resistencia a Antiparasitarios:***

El Grupo de Trabajo será coordinado por el sector oficial de Uruguay con la colaboración de ADIPRAVE y CEV (Uruguay) e integrado por los sectores oficiales de Argentina Brasil, Costa Rica, Cuba, Guatemala y México, así como CAPROVE y CLAMEVET (Argentina), SINDAN (Brasil), ASIFAN y Cámara de Insumos Agropecuarios (Costa Rica), ASOVET (Guatemala) e INFARVET-CANIFARMA (México),

### ***Criterios para la habilitación de Plantas Mixtas***

El Grupo de Trabajo será coordinado por CLAMEVET, e integrado por los sectores oficiales de Argentina y Guatemala, con la participación de CAPROVE (Argentina), ALANAC y SINDAN (Brasil), ASIFAN y Cámara de Insumos Agropecuarios (Costa Rica), y ALFA (El Salvador).

### ***Criterios para la exención de registro de productos veterinarios***

El Grupo de Trabajo será coordinado por ALANAC e integrado por los sectores oficiales de Chile, Canadá, Guatemala ,y Argentina , con la participación de CAPROVE y CLAMEVET (Argentina), SINDAN (Brasil), ANVET (Chile), ASIFAN y Cámara de Insumos Agropecuarios (Costa Rica), y ASOVET (Guatemala),

### ***Conformación de la Mesa Ejecutiva***

Ante la falta de arribo a un consenso entre los representantes de las Cámaras presentes, para la elección de un cargo en representación del Sector Privado en la Mesa Ejecutiva, se resolvió que dicho cargo permaneciera vacante, hasta la conformación de la nueva Mesa Ejecutiva en la próxima reunión de CAMEVET en el año 2016. Esta decisión fue adoptada por unanimidad de la totalidad de los representantes del sector oficial.

### ***Aprobación de la propuesta para nuevas sedes para los próximos Seminarios***

Se acepta la propuesta de México para la realización del XXII Seminario en ese país, como así también la propuesta de la delegación de Paraguay para realizar el XXIII Seminario del año 2017 en su país.

### ***Presupuesto y recursos de CAMEVET***

El Dr. Martin Minassian realizó la presentación del balance de CAMEVET correspondiente al presupuesto hasta el 31 de octubre del corriente año.

Se asignó una suma de hasta USD 50.000 para el apoyo para la participación de los Puntos Focales Nacionales. El balance fue aprobado, y se adjunta como Anexo.

### ***Conclusiones y recomendaciones. Lectura y aprobación del documento final.***

*El documento conteniendo las conclusiones y recomendaciones fue leído y aprobado.*

## Lista de Anexos

**Anexo I** – Acta de la reunión plenaria del sector oficial

**Anexo II** – Acta de la reunión plenaria del sector privado

**Anexo III** - Guía para el registro de productos veterinarios nutracéuticos /Complementos dietarios

**Anexo IV** - Guía de Pruebas de Potencia para vacunas inactivadas que contienen virus PI3, modelo cobayo.

**Anexo V** - Seguridad de vacunas en bovinos – Guía para estudios con vacunas inactivadas.

**Anexo VI** - Guía para Pruebas de Potencia para vacunas inactivadas que contengan rotavirus bovinos

**Anexo VII** – Balance 2015- 2016

*Lista de siglas utilizadas en el documento*

<b>ADIPRAVE:</b>	ASOCIACIÓN DE LAS INDUSTRIAS DE PRODUCTOS AGROQUÍMICOS Y VETERINARIOS (URUGUAY)
<b>ALANAC:</b>	ASOCIACIÓN DE LABORATORIOS FARMACÉUTICOS NACIONALES (BRASIL) (ASSOCIAÇÃO DOS LABORATÓRIOS FARMACÊUTICOS NACIONAIS)
<b>ANVET:</b>	ASOCIACIÓN NACIONAL DE LABORATORIOS VETERINARIOS (CHILE)
<b>CAMEVET:</b>	COMITÉ DE LAS AMÉRICAS DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS
<b>CAPROVE:</b>	CÁMARA ARGENTINA DE LA INDUSTRIA DE PRODUCTOS VETERINARIOS
<b>CEV:</b>	CÁMARA DE ESPECIALIDADES VETERINARIAS (URUGUAY)
<b>CLAMEVET:</b>	CÁMARA DE LABORATORIOS ARGENTINOS MEDICINALES VETERINARIOS
<b>FDA:</b>	U S FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - ADMINISTRACIÓN DE MEDICAMENTOS Y ALIMENTOS
<b>FIVETCA:</b>	FEDERACIÓN DE INDUSTRIA VETERINARIA CENTROAMERICANA
<b>INFARVET / CANIFARMA:</b>	INDUSTRIA FARMACÉUTICA VETERINARIA – CANIFARMA (MÉXICO)
<b>OIE:</b>	ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL
<b>OIRSA:</b>	ORGANISMO INTERNACIONAL REGIONAL DE SANIDAD AGROPECUARIA
<b>SENASA:</b>	SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA (ARGENTINA)
<b>SINDAN:</b>	SINDICATO NACIONAL DA INDUSTRIA DE PRODUTOS PARA SAÚDE ANIMAL
<b>VICH:</b>	INTERNATIONAL COOPERATION ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS
<b>CAPALVE</b>	CÁMARA DE LABORATORIOS PARAGUAYOS DE PRODUCTOS VETERINARIOS
<b>CADIN</b>	CAMARA DE INDUSTRIAS DE NICARAGUA
<b>ASOVET</b>	ASOCIACION DE DISTRIBUIDORES DE PRODUCTOS VETERINARIOS
<b>LABIOFAM</b>	GRUPO EMPRESARIAL LABIOFAM
<b>CIA</b>	CÁMARA DE INSUMOS AGROPECUARIOS
<b>ASIFAN</b>	ASOCIACIÓN FARMACÉUTICA DE LA INDUSTRIA NACIONAL
<b>ALFA</b>	ASOCIACIÓN DE LABORATORIOS FARMACÉUTICOS DE EL SALVADOR

## **ANEXO I**

### **Plenaria del Sector Oficial**

Se abrió la sesión a las 18:00 hs, en el Hotel Casa Santo Domingo, en Antigua Guatemala, sede del CAMEVET 2015, la Dra. María Eugenia Paz Díaz, Punto Focal de Guatemala inicio la sesión como Coordinadora de la Plenaria, quien fue propuesta por la Mesa Ejecutiva del CAMEVET.

Los temas fueron los siguientes

1.- Farmacovigilancia : Se vio la necesidad de que este tema sea tratado a nivel de CAMEVET por su importancia, por lo tanto es importante elaborar una guía para las notificaciones y posteriormente establecer un Red de notificaciones entre los países del CAMEVET.

Centroamérica ha comenzado a trabajar con la colaboración del IICA.

Argentina tiene ya estructurado un sistema de farmacovigilancia y este proceso se encuentra en la web. Este sistema funciona a partir de una denuncia.

Costa Rica sugiere hacer una guía específica y establecer una guía para las notificaciones

2.- Etiquetado: Jamaica opina que existía problemas en la reutilización de envases vacíos de productos veterinarios y bolsas de vacíos de alimentos medicados. Argentina opina que el desecho de tales materiales recae sobre el ministerio del medio ambiente sin embargo el apoyo de otras entidades es imprescindible. República Dominicana opina que la Guía para reutilización de cajas y envases se puede incluir en un documento de Buenas Practicas Ganaderas. Se recomienda revisar la guía de Etiquetado e incluir “desechos de envases”.

3.- Biotecnología: Guatemala se encuentra interesado en las normativas sobre guía de registro de vacunas en base a biotecnología y solicita capacitaciones al respecto, Cuba informa que desde hace 2 años se tiene la propuesta para guía de registro de productos en base a biotecnología.

4.- Participación de puntos focales en CAMEVET. México acota que existen dificultades para la participación de Oficiales en las reuniones de CAMEVET debidos a problemas administrativos en esos países. Propone la posibilidad de que las industrias puedan financiar la asistencia de ellos en cada caso en particular.

Se cierra la sesión a 19:30 hs.

## **ANNEX II**

### REUNIÓN DE INDUSTRIA

Se abrió la sesión a las 17:20 minutos, en el Salón el Atrio, Hotel Casa Santo Domingo, en Antigua Guatemala, sede del CAMEVET 2015, el Sr. Leonel Rodas inicio la sesión proponiendo los temas propuestos por la mesa directiva del CAMEVET.

- 1.- Cambio de fecha del evento del CAMEVET, Agosto seria la nueva fecha propuesta.
- 2.- Farmacovigilancia.
- 3.- Resistencia de antiparasitarios (Necesario presentar una propuesta)
- 4.- Reconocimiento de Dr. Milson de SINDAN, Brasil, quien propone a Laura Lorenzetti Jorge para tomar su posición en la mesa directiva.

Reunión:

- 1.- . En la reunión general de la industria se discute en relación al tema 4. el cual debe ir a votación siguiendo los reglamentos.
- 2.- Industria Centro Americana, plantea la falta de personal en los servicios veterinarios, solicitan la revisión de forma y la aplicación del RTCA. La industria regional, expresa que la homologación de los registros en algunos países de la región el proceso no se ha dado.
- 3.- Bruno Forti, de Argentina (CLAMEVET), solicita se considere el caso de productos que no necesitan registro en Europa, ni Estados Unidos, y que son de Libre Venta, en algunos países de nuestra región se exige su registro como medicamentos.
- 4.-Se solicita se analice el tema de los productos veterinarios que se fabrican en plantas que producen también productos de salud humana, y que en algunos países de nuestra región se deben fabricar en plantas separadas por lo que no se pueden importar.
- 5.- Debe quedar muy claro que las guías que se aprueban son guías y no reglamentos que deben aplicarse obligatoriamente. Carlos Francia aclara que las guías emitidas son documentos de referencia, haciendo énfasis en eso.
- 6.- Hay falta de oficiales de registro de algunos países, lo cual le preocupa a la Industria fue manifestado por algunos participantes, y fue punto de énfasis de ALANAC a través de su representante Javier Carracedo, debido a la importancia que tiene el foro, se solicita hacer una comunicación, al respecto, el Dr. Argento considera debe someterse a discusión de la mesa, el tipo de comunicación relacionado con este aspecto.
- 7.- Falta de compromiso de la revisión de documentos técnicos, lo cuales, son circulados, y se necesita participación y opinión de todos los involucrados.

**COMPLEMENTOS DIETARIOS**

# INSCRIPCIÓN DE COMPLEMENTOS DIETARIOS

## Introducción

Existen en distintos países, diversos productos de administración oral, destinados a los animales, que por sus características, son de difícil definición como medicamentos, o como alimentos. Esto hace que su tratamiento desde el punto de vista regulatorio pueda resultar ambiguo. Para corregir esto, se propone crear, dentro del ámbito del registro de productos veterinarios, una Solicitud de Inscripción específica para estos productos, que se propone identificar como “Complementos dietarios” e incluye entre otros a los nutraceuticos, los suplementos dietarios, los probióticos, los prebióticos y los extractos vegetales.

## Puntos Clave

- Los complementos dietarios juegan un papel cada vez más importante como ayuda en el tratamiento y prevención de enfermedades en humanos y animales.
- En muchos casos es difícil establecer claramente si se trata de un alimento o de un medicamento. Por lo tanto no están regulados por los organismos de registro y no están sometidos a una evaluación previa a su comercialización.
- La falta de una regulación específica que establezca información sobre seguridad y eficacia para los complementos dietarios, no justifica ignorar el beneficio terapéutico potencial de algunos de estos productos.
- No se debe asumir que sean más seguros o mejores que los medicamentos solo por ser “naturales”, dado que muchos complementos dietarios pueden ser sintéticos, y natural no es sinónimo de seguro.

## Objetivo y Alcance

**Objetivo:** Definir una Solicitud de Inscripción específica para la inscripción Complementos Dietarios.

**Alcance:** Complementos dietarios

## Términos y Definiciones

Los complementos dietarios son sustancias o mezcla de sustancias, que se obtienen en forma sintética o natural y que se administran por vía oral exclusivamente, en distintas formas farmacéuticas líquidas, sólidas o semisólidas tales como: soluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes, gotas, granulados, polvos, comprimidos, cápsulas, pastas y geles, con el fin de mejorar la salud y el bienestar de los animales.

---

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Paseo Colón 315, 5to. Piso Of. D Buenos Aires, Argentina

Tel/Fax: (54-11) 4331 – 3919/4939/5158/5165

e-mail: [rr.americas@oie.int](mailto:rr.americas@oie.int) Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

## Procedimiento

1. Adoptar la Solicitud de Inscripción de Complementos Dietarios que forma parte de la presente, para la inscripción de estos productos ante la autoridad del registro oficial de productos veterinarios.
2. Dicha Solicitud de Inscripción tendrá el carácter de Declaración Jurada, comprometiéndose la firma responsable a garantizar la seguridad, inocuidad y ausencia de residuos peligrosos en cantidades superiores a las permitidas de cualquier sustancia presente en los productos a inscribir.
3. Los productos complementos dietarios objeto de la presente norma, serán elaborados en plantas elaboradoras de medicamentos veterinarios debidamente habilitadas por la autoridad sanitaria y deberán cumplir con las normas de BFPV en lo que corresponda al tipo de producto en cuestión.

## Referencias

Código Alimentario Argentino, Artículo 1381 y siguientes.

Ekta K Kaira, Nutraceutical – Definition and Introduction. AAPS PharmaSci 2003; 5 (3) Article 25 (<http://www.pharmasci.org>)

Dawn Merton Boothe, DVM, PhD, ACVIM, ACVCP. NUTRACÉUTICOS EN MEDICINA VETERINARIA Parte I – Definiciones y Reglamentaciones. Departamento de Fisiología y Farmacología Veterinaria Facultad e Medicina Veterinaria Texas A&M University College Station, Texas.

Dawn Merton Boothe, DVM, PhD, ACVIM, ACVCP. NUTRACÉUTICOS EN MEDICINA VETERINARIA Parte II – Seguridad y Eficacia. Departamento de Fisiología y Farmacología Veterinaria Facultad e Medicina Veterinaria Texas A&M University College Station, Texas.

## Autores

Cámara de Laboratorios Argentinos de Medicamentos Veterinarios (CLAMEVET)

## Nivel de aprobación

- XV Seminario de Armonización de Normas de Registro y Control de Medicamentos Veterinarios – Guadalajara – México 10 al 15 de Agosto de 2009 (Trámite I)

## Fecha de vigencia

## Periodicidad de revisión

10 años



**FORMULARIO DE INSCRIPCIÓN  
PARA  
COMPLEMENTOS DIETARIOS  
DE USO VETERINARIO**

**FECHA**

**1. - NOMBRE COMERCIAL DEL PRODUCTO**

**2. – CLASIFICACIÓN: Complemento Dietario**

**3. - ESTABLECIMIENTO SOLICITANTE: PROPIETARIO / REPRESENTANTE LEGAL**

3.1.- Nombre:

3.2.- Domicilio (Calle – Ciudad – País):

3.3.- Habilitación Oficial N°:

3.4.- Responsable Técnico:

3.4.1.- Profesión:

3.4.2.- Identificación Profesional N° (Matrícula o Registro):

**4. – ESTABLECIMIENTO ELABORADOR (para productos elaborados en el país)**

4.1.- Nombre:

4.2.- Domicilio (Calle – Ciudad – País):

4.3.- Habilitación Oficial N°:

4.4.- Responsable Técnico:

4.4.1.- Profesión:

4.4.2.- Identificación Profesional N° (Matrícula o Registro):

**5. – ESTABLECIMIENTO FRACCIONADOR (para productos elaborados en el país)**

5.1.- Nombre:

5.2.- Domicilio (Calle – Ciudad – País):

5.3.- Habilitación Oficial N°:

5.4.- Responsable Técnico:

5.4.1.- Profesión:

5.4.2.- Identificación Profesional N° (Matrícula o Registro):

**6. - ESTABLECIMIENTO ELABORADOR EN ORIGEN (para productos importados)**

6.1.- Nombre:

6.2.- Domicilio (Calle – Ciudad – País):

6.3.- N° de Habilitación Oficial:

6.4.- Responsable Técnico:

6.4.1.- Profesión:

6.4.2.- Identificación Profesional N° (Matrícula o Registro):

**7.- DOCUMENTOS LEGALES (según corresponda)**

---

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Paseo Colón 315, 5to. Piso Of. D Buenos Aires, Argentina

Tel|Fax: (54-11) 4331 – 3919/4939/5158/5165

e-mail: [rr.americas@oie.int](mailto:rr.americas@oie.int) Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

Página 4 de 7

- 7.1.- Convenio/s de fabricación.
- 7.2.- Convenio de Representación del Elaborador en origen.
- 7.3.- Certificado de Habilitación del Establecimiento Elaborador.
- 7.4.- Para productos importados: Certificado de Registro y Libre Venta o documentación equivalente. En caso que el producto no necesite registro en el país de origen, nota aclaratoria.

## **8. - FORMA FARMACÉUTICA**

## **9. - FORMULA CUALI - CUANTITATIVA**

Se emplearán las denominaciones comunes recomendadas por los Organismos Internacionales reconocidos cuando existan, o en su defecto, las denominaciones comunes usuales o las denominaciones químicas.

## **10.- ESPECIFICACIONES DE LOS COMPONENTES DE LA FÓRMULA**

## **11. - METODOLOGÍA DE ELABORACIÓN DEL PRODUCTO**

Describir resumidamente el proceso de fabricación.

## **12. –CONTROL DEL PRODUCTO TERMINADO**

Especificaciones del producto terminado.

Control de proceso

## **13. - FORMA DE PRESENTACIÓN Y CONTENIDO**

## **14. – ESPECIFICACIÓN Y CONTROL DE ENVASES**

14.1 Características del envase

14.2 Sistema de inviolabilidad

14.3 Control de calidad de envases

## **15.- PERIODO DE VALIDEZ (Vencimiento)**

## **16. - INDICACIONES DE USO**

16.1.- Principales y/o complementarias, si las tuviere.

## **17. - VÍA DE APLICACIÓN y FORMA DE ADMINISTRACIÓN o UTILIZACIÓN DEL PRODUCTO**

La vía de administración será exclusivamente oral.

## **18. – PREPARACIÓN DEL PRODUCTO E INSTRUCCIONES PARA SU CORRECTO USO Y CONSERVACIÓN.**

## **19. – ESQUEMA DE ADMINISTRACIÓN**

---

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Paseo Colón 315, 5to. Piso Of. D Buenos Aires, Argentina

Tel|Fax: (54-11) 4331 – 3919/4939/5158/5165

e-mail: [rr.americas@oie.int](mailto:rr.americas@oie.int) Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

19.1 Indicar la cantidad de ingesta del producto por especie o edad

19.2 Tiempo de suministro

**20. - EFECTOS COLATERALES POSIBLES, INCOMPATIBILIDADES Y ANTAGONISMOS FARMACOLÓGICOS**

20.1.- Contraindicaciones y limitaciones de uso (casos en que su administración puede dar lugar a efectos nocivos).

20.2.- Precauciones que deben adoptarse antes, durante o después de su administración.

**21. - PRECAUCIONES GENERALES**

Describir la forma adecuada de almacenamiento, transporte y destrucción del producto.

**22. - CAUSAS QUE PUEDEN HACER VARIAR LA CALIDAD DEL PRODUCTO**

Precipitaciones, disociaciones, disminución o pérdida de actividad de los principios activos, frío, calor, luz, humedad, compresión en estibas o depósitos.

**23.- CONSERVACIÓN CORRECTA DEL PRODUCTO**

**24 – INDICAR EL PERÍODO DE VALIDEZ.**

**25. – ETIQUETAS Y FOLLETOS**

Se adjuntarán a la presente los proyectos de impresos.

**26.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y/O ENSAYOS REALIZADOS.**

**LA PRESENTE TIENE CARÁCTER DE DECLARACIÓN JURADA.**

**Firma y aclaración del  
DIRECTOR TÉCNICO**

**Firma y aclaración del  
APODERADO DEL  
ESTABLECIMIENTO SOLICITANTE**

**LA FIRMA GARANTIZARÁ LA SEGURIDAD E INOCUIDAD DEL PRODUCTO Y LA AUSENCIA, EN CASO DE SUMINISTRARSE A ANIMALES DE CONSUMO, DE RESIDUOS EN CANTIDADES SUPERIORES A LAS PERMITIDAS DE CUALQUIER PRINCIPIO ACTIVO PRESENTE EN EL PRODUCTO A INSCRIBIR.**

---

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Paseo Colón 315, 5to. Piso Of. D Buenos Aires, Argentina

Tel/Fax: (54-11) 4331 – 3919/4939/5158/5165

e-mail: [rr.americas@oie.int](mailto:rr.americas@oie.int) Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

Página 6 de 7

**EL ESTABLECIMIENTO SOLICITANTE DE LA INSCRIPCIÓN, UNA VEZ OBTENIDO EL CERTIFICADO QUE AUTORIZA SU USO Y COMERCIALIZACIÓN, SE COMPROMETE A COMUNICAR AL ORGANISM COMPETENTE (REGISTRANTE) LA FECHA DE LA PRIMERA SERIE ELABORADA O DE LA PRIMERA PARTIDA A SER IMPORTADA.**

Los complementos dietarios son sustancias o mezcla de sustancias no medicamentosas, que se obtienen en forma sintética o natural y que se administran por la vía oral exclusivamente, con el fin de mejorar la fisiología y el bienestar de los animales.

Los complementos dietarios no pueden incluir indicaciones terapéuticas.

Cuando exista una dosis internacionalmente aceptada como terapéutica , la dosis indicada para el Complemento Dietario no podrá superar el 50 % de la misma.

28 de septiembre del 2012

C A M E V E T

Cod: 000

TRÁMITE I

FECHA: 4 de octubre de 2012

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



## AUTORES

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

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

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

## Tabla de contenidos

Prólogo .....	3
1. Introducción .....	5
2. Guía: Control de potencia en cobayos .....	6
2.1. Diseño de la prueba .....	7
2.1.1. Cobayos .....	7
2.1.2 Procedimiento .....	7
2.1.3. Interpretación .....	8
2.1.4. Criterio de validación de la prueba .....	8
2.1.5. Cálculos .....	9
2.1.6. Criterio de aprobación .....	9
3. Armonización de ensayos para la región .....	9
4. Referencias .....	10

## Prólogo

### ***PROSAIA: La Seguridad Alimentaria y la producción de productos farmacéuticos veterinarios.***

“Animales sanos, alimentos sanos, gente sana”.

La Argentina como productora de alimentos de calidad afronta entre otros desafíos el acecho de enfermedades infecciosas emergentes y re-emergentes que, debido a los cambios culturales ocurridos en el mundo en los últimos años, se hallan en continua expansión (BSE, Influenza Aviar, Nipah, West Nile Fever, Rift Valley Fever entre otras). Muchas de estas son zoonosis, lo que ha ocasionado cambios muy profundos en los sistemas de garantías exigidos por las autoridades sanitarias, entre las cuales la seguridad sanitaria de los alimentos es un requisito indispensable. Para alcanzar la seguridad alimentaria de los alimentos es necesario, entre otras condiciones, disponer de productos farmacéuticos veterinarios y biológicos de seguridad y pureza probadas que garanticen, junto con su correcta aplicación, que los productos y subproductos obtenidos de los animales se conviertan en alimentos que no sean causantes de enfermedades por la presencia de contaminantes o agentes patógenos, en forma involuntaria -inocuidad- o deliberada -bioterrorismo- y contribuir así a preservar la salud y protección de los consumidores.

Para eso existen principios fundamentales que se deben tener en cuenta en la formulación de los insumos para los animales de abasto incluidos los alimentos y los productos farmacológicos. Estos principios incluyen el control de la fuente, la manipulación de los materiales utilizados y el diseño de un sistema de elaboración adecuado que contemple:

#### ***La normativa, recomendaciones y estándares nacionales e internacionales.***

Este es un aspecto primordial que deben cumplir todos los productos farmacéuticos veterinarios ya que, de no ser así, se corre el riesgo de que los productos y subproductos obtenidos de los animales tratados queden fuera de los mercados.

#### ***Las Buenas Prácticas de Manufactura.***

“Buenas Prácticas de Manufactura es aquella parte del aseguramiento de la calidad que garantiza que los productos sean consistentemente producidos y controlados de acuerdo a los estándares de calidad apropiados al uso al que están destinados y según lo requiera su autorización de comercialización.” WHO Good Manufacturing Practices for Pharmaceutical Products.

Por lo tanto, mantenerse y desarrollar un negocio competitivo como proveedores de alimentos dentro de este contexto presupone además cumplir con los requisitos implícitos y explícitos que los consumidores demandan. Entre esos requisitos los atributos de inocuidad involucran la aplicación de sistemas de aseguramiento de la calidad tales como Buenas Prácticas Agrícolas, Buenas Prácticas de Manufactura, HACCP, determinación de niveles o ausencia de residuos, de pesticidas, de



antibióticos, garantía de que los productos farmacológicos utilizados en el control de las enfermedades de los animales cumplen con las normas internacionales.

Dentro de este marco de referencia y en cumplimiento de los objetivos de su creación, PROSAIA convocó a los principales referentes en la materia del organismo regulador SENASA, la Academia y las cámaras representativas a conformar un Grupo Ad-Hoc para la Redacción y Actualización de Guías, Protocolos y Normativas para el Correcto Desarrollo de Productos Veterinarios, como un aporte para la adecuación a los tiempos que vivimos.

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized, overlapping loops and curves, set against a light pink rectangular background.

Dr. Carlos Van Gelderen

A handwritten signature in black ink, appearing as a series of fluid, connected strokes, set against a light pink rectangular background.

Dr. Alejandro Schudel

# **PRUEBA DE POTENCIA PARA VACUNAS BOVINAS QUE CONTENGAN EN SU FORMULACIÓN VIRUS PARAINFLUENZA 3 BOVINO (PI-3)**

## **1. INTRODUCCION**

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

El virus de PI-3 bovino ha sido reconocido extensamente por años como un agente causal de infección endémica del ganado bovino. Actualmente, se lo reconoce como un agente participante del complejo de enfermedades respiratorias del bovino pero su rol en la patogenia es de menor importancia que el del virus respiratorio sincitial bovino (VRSB). La presentación clínica de la infección por PI-3 puede ser muy variable desde infecciones asintomáticas hasta enfermedad respiratoria severa caracterizada por tos seca, fiebre y descarga nasal (Morein and Dinter, 1975). La presentación clínica se dá principalmente en terneros con bajos niveles de anticuerpos pasivo y en animales sometidos a stress. La infección por PI-3 puede contribuir a un estado de inmunosupresión y lesión tisular que desemboque en una broncopneumonía severa generada por infecciones bacterianas secundarias (Haanes et al., 1997). PI-3 se reconoce como un agente importante de la pneumonia enzoótica en terneros y como agente participante del complejo respiratorio de en bovinos de feedlot de EE.UU. y posiblemente a nivel mundial El virus de PI-3 fue aislado por primera vez de bovinos con síntomas respiratorios en EE UU. Actualmente la infección es endémica y presenta distribución mundial. La infección natural es, en general, asintomática o suele cursar con sintomatología leve. Sin embargo, la infección por PI-3 predispone al ganado a sufrir infecciones bacterianas secundarias como pneumonía aguda por *pasteurella* o el síndrome conocido como “shipping fever” (Ellis, 2010). En nuestro país la infección por PI-3 fue detectada por evidencia serológica en la década del 80’ (Lager, 1983). Relevamientos serológicos realizados en la década del 2000 en rodeos bovinos no vacunados de Jujuy y Neuquén indicaron que el 100% de los bovinos adultos resultaron seropositivos para anticuerpos contra este agente viral, sugiriendo a amplia circulación del agente en el país (Marcoppido et al., 2010 ; Robles, 2008).

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

Las Hemoaglutininas (HA) presentes en la superficie de este virus pueden ser bloqueadas en su función por la presencia de anticuerpos. Estos se dirigen contra los antígenos específicos responsables de la unión a glóbulos rojos. La Inhibición de la Hemoaglutinación (IHA) es una técnica rápida, económica y de fácil implementación en laboratorios de poca infraestructura que permite dosar estos anticuerpos. Esta técnica serológica resulta una herramienta útil para relevar la presencia de animales infectados en los rodeos (relevamientos serológicos) o para evaluar la respuesta inducida por una vacunación, tanto en la especie de destino como en los modelos animales de laboratorio. Los animales expuestos al virus (post infección y/o vacunación) aumentan significativamente el título de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación (IHA). Para los agentes virales hemoaglutinantes de las familias virales orthomixoviridae y paramixoviridae el título de anticuerpos IHA en suero se asocian con protección a la infección (Beyer et al., 2004; de Jong et al., 2003; Lee et al., 2001).

En el mercado existen numerosas vacunas polivalentes para prevenir el síndrome respiratorio del bovino. Las vacunas pueden ser a virus vivo atenuado o inactivadas. En el caso de estas últimas, se formulan en adyuvante acuoso u oleoso con el virus PI-3 inactivado acompañado de otros antígenos virales (BoHV-1, BDVD y BRSV) y antígenos bacterianos. El umbral mínimo de anticuerpos calostrales que deben poseer los terneros para estar protegidos frente a la infección natural por PI-3 ha sido reportado como 1/32 (en nuestro método con un título en UIHA =  $32 * 8 = 256$ ; expresado en  $\log_{10} = 2.4$ ) (Ellis, 2010).

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

## **2. GUÍA: CONTROL DE POTENCIA EN COBAYOS**

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

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

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

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

## **2.1 Diseño de la prueba**

### **2.1.1 Cobayos**

Se utilizan como mínimo 6 animales por cada vacuna, mayores a 30 días de edad y el peso debe ser de 400 gramos  $\pm$  50 gramos. Pueden utilizarse machos o hembras pero cada grupo debe contener animales del mismo sexo, con un plazo de adaptación después del ingreso a la sala de inoculación de SIETE (7) días como mínimo., luego de este periodo y antes de iniciar la inmunización se recomienda la toma de muestras de suero para descartar la presencia de Ac IHA anti-PI-3. En caso de que los animales resulten seropositivos previo a la inmunización, no podrán utilizarse en la prueba.

### **2.1.2 Procedimiento**

Los cobayos se inmunizan con dos dosis de vacuna (en un intervalo de 21 días), por vía subcutánea, con un volumen correspondiente a 1/5 de la dosis bovina. Los animales se mantienen bajo control durante un mínimo de 30 días y se toman muestras de suero al momento de la primera dosis de vacuna (0 días post-vacunación) y 9 días post-revacunación (30 DPV). Conjuntamente con la evaluación de la/s vacuna/s incógnita (n=6), se incluyen dos grupos de cobayos, uno vacunado con *una vacuna de referencia* de potencia conocida (n=6) y un grupo de animales testigos no vacunados (n=4). A los treinta (30) días de iniciado el control, se sangran los animales vacunados, realizándoles el control serológico por la técnica de inhibición de la hemoaglutinación (IHA) (ANEXO 2).

### 2.1.3 Interpretación

El análisis de regresión lineal del título de anticuerpo determinado por IHA realizado durante la validación del modelo cobayo para la valencia PI-3 indicó que la respuesta de anticuerpos inducida por la vacunación con PI-3, en bovinos y cobayos, es directamente proporcional a la concentración de antígeno (Ag) contenido en la vacuna (ensayo dosis-respuesta). El modelo cobayo fue capaz de discriminar significativamente entre vacunas formuladas con concentraciones de Ag de 1 log de diferencia. A partir de los resultados obtenidos en la curva dosis-respuesta, se estimaron puntos de corte o rango de títulos de Ac IHA anti-PI-3 que permiten diferenciar las vacunas según la inmunogenicidad inducida en cobayos y bovinos. Se establecieron dos puntos de corte y tres categorías (Tabla 1) ( ver detalles técnicos de la validación en el ANEXO I).

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

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

**Tabla 1.** Puntos de corte determinados como el log<sub>10</sub> del título de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación (IHA) o unidades inhibitorias de la hemoaglutinación de glóbulos rojos de cobayos causada por el virus de PI-3 presentes en el suero de cobayos y bovinos vacunados con la vacuna incógnita. (y) Título promedio de Ac de grupos de 5 cobayos, evaluado a los 30 días post vacunación (dpv); (Y) grupos de 5 bovinos evaluados a los 60 dpv. Los bovinos reciben dos dosis de vacuna con un intervalo de 30 días y se muestrean a los 0 y 60 dpv. Los cobayos reciben dos dosis de vacuna (1/5 del volumen de la dosis bovina) con un intervalo de 21 días y se muestrean a los 0 y 30 dpv.

Títulos de Ac IHA mayores a 2.4 en cobayos y 3.1 en bovinos se asociaron a vacunas de potencia muy satisfactoria. Vacunas con títulos de Ac IHA entre 1.50 y 2.4 en cobayos y entre 2.8 y 3.1 en bovinos se asociaron a vacunas de inmunogenicidad

satisfactoria. En cambio, vacunas que inducen títulos de Ac IHA inferiores a dichos títulos se consideran no satisfactorias (ANEXO I).

#### **2.1.4 Criterio de validación de la prueba en cobayos**

La prueba de potencia en cobayos se considera válida cuando el promedio obtenido del título de Ac de los animales vacunados con una vacuna de referencia, de calidad satisfactoria, resulta el valor esperado (mayor a 1.50 en cobayos y 2.80 en bovinos), y los cobayos controles no vacunados (testigos) permanecen seronegativos para Ac inhibidores de la hemoaglutinación contra PI-3 durante toda la experiencia.

#### **2.1.5 Cálculos**

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

#### **2.1.6 Criterio de aprobación**

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

### **3. ARMONIZACIÓN DE ENSAYOS PARA LA REGIÓN**

Se debe contar con un panel de sueros controles positivos y negativos para anticuerpos contra PI-3, así como vacunas de referencia. Estos reactivos de referencia locales se utilizarán para armonizar los resultados obtenidos por cada laboratorio de ensayos que adopte este método de control. La vacuna de referencia permitirá establecer la conformidad del ensayo de inmunización de cobayos, mientras que el panel de sueros podrá utilizarse como control de la técnica serológica recomendada (IHA) y para la estandarización de otros ensayos alternativos (ELISA y VN).

#### 4. REFERENCIAS

- Akkermans, A.M., Hendriksen, C.F., 1999, Statistical evaluation of numbers of animals to be used in vaccine potency testing: a practical approach. *Developments in biological standardization* 101, 255-260.
- Beyer, W.E., Palache, A.M., Luchters, G., Nauta, J., Osterhaus, A.D., 2004, Seroprotection rate, mean fold increase, seroconversion rate: which parameter adequately expresses seroresponse to influenza vaccination? *Virus research* 103, 125-132.
- de Jong, J.C., Palache, A.M., Beyer, W.E., Rimmelzwaan, G.F., Boon, A.C., Osterhaus, A.D., 2003, Haemagglutination-inhibiting antibody to influenza virus. *Developments in biologicals* 115, 63-73.
- Ellis, J.A., 2010, Bovine parainfluenza-3 virus. *The Veterinary clinics of North America* 26, 575-593.
- EMA/P038/97 1998. Position Paper on Batch Potency Testing Of Immunological Veterinary Medical Products, CVMP/IWP, V.M.E.U., ed. (The European Agency for the Evaluation of Medical Products).
- Haanes, E.J., Guimond, P., Wardley, R., 1997, The bovine parainfluenza virus type-3 (BPIV-3) hemagglutinin/neuraminidase glycoprotein expressed in baculovirus protects calves against experimental BPIV-3 challenge. *Vaccine* 15, 730-738.
- Halder, M., Hendriksen, C., Cussler, K., Balls, M., 2002, ECVAM's contributions to the implementation of the Three Rs in the production and quality control of biologicals. *Altern Lab Anim* 30, 93-108.
- Hendriksen, C.F., 2009, Replacement, reduction and refinement alternatives to animal use in vaccine potency measurement. *Expert review of vaccines* 8, 313-322.
- Lager, L., Sadir A, Schudel A: 1983, 1983, Enfermedades respiratorias virales de bovinos. . *J Información y Desarrollo en Investigación Agropecuaria* 1, 55-58.
- Lee, M.S., Greenberg, D.P., Yeh, S.H., Yogev, R., Reisinger, K.S., Ward, J.I., Blatter, M.M., Cho, I., Holmes, S.J., Cordova, J.M., August, M.J., Chen, W., Mehta, H.B., Coelingh, K.L., Mendelman, P.M., 2001, Antibody responses to bovine parainfluenza virus type 3 (PIV3) vaccination and human PIV3 infection in young infants. *The Journal of infectious diseases* 184, 909-913.
- Maidana, S.S., Lomonaco, P.M., Combessies, G., Craig, M.I., Diodati, J., Rodriguez, D., Parreno, V., Zabal, O., Konrad, J.L., Crudelli, G., Mauroy, A., Thiry, E., Romera, S.A., 2012, Isolation and characterization of bovine parainfluenza virus type 3 from water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Argentina. *BMC veterinary research* 8, 83.
- Marcoppido, G., Parreno, V., Vila, B., Antibodies to pathogenic livestock viruses in a wild vicuña (*Vicugna vicugna*) population in the Argentinean Andean altiplano. *Journal of wildlife diseases* 46, 608-614.
- Morein, B., Dinter, Z., 1975, Parainfluenza-3 virus in cattle: mechanisms of infections and defence in the respiratory tract. *Veterinarno-meditsinski nauki* 12, 40-41.
- Parreño, V.R., D.; Vena, M.; Izuel, M.; Fillippi, J.; Lopez, M.; Fernandez, F.; Bellinzoni, R. and Marangunich, L. 2010. Development and statistical validation of a guinea pig model as an alternative method for bovine viral vaccine potency testing. In *Symposium: Practical Alternatives to reduce animal testing in quality control of veterinary biologicals in the Americas*, PROSAIA, ed. (Buenos Aires).
- Parreño, V.V., María Marta; Rodríguez, Daniela; Izuel, Mercedes; Marangunich, Laura; Lopez, Virginia; Romera, Alejandra; Fillippi, Jorge; Bellinzoni, Rodolfo; Fernandez, Fernando. 2008. Validación estadística de un Modelo Cobayo aplicado al control de calidad inmunogénica

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



## ANEXO 2

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

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

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

#### MATERIALES

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

#### EQUIPOS

- Micropipeta hasta 200µl (tolerancia máxima admitida: 5ul)

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

#### REACTIVOS

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

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

Preparación: Los sueros controles corresponden a pools de sueros de cobayos vacunados con vacunas de concentración de Ag conocida. Para confeccionar los pools se seleccionan sueros con títulos medios (320-640 UIHA) (control positivo) y o sueros de animales negativos (control negativo).

Como estándares se utilizar sueros de cobayos de título conocido, preferentemente altos (1260 UIHA) y sueros negativos de cobayos no vacunados.

#### TRATAMIENTO PREVIO DE LAS MUESTRAS

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

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

## PREPARACIÓN DE LA DILUCIÓN DE GLÓBULOS ROJOS

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

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

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

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

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

## PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO DE IHA

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

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

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

## LECTURA

La lectura se realiza por visualización directa.

## ACEPTACIÓN DEL ENSAYO (CONFORMIDAD)

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

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

Se tomará como punto final de la actividad del suero (título de Ac IHA anti PI-3) a la inversa de la máxima dilución en la que el fenómeno de hemoaglutinación ha sido inhibido. El resultado final se expresa en Unidades Inhibidoras de la Hemoaglutinación (UIHA). Este resultado se obtiene multiplicando la recíproca de la dilución de punto final de la actividad del suero por las unidades hemoaglutinantes del virus utilizado (8 UHA). El resultado se expresará como el número de unidades inhibidoras de la hemoaglutinación del suero por unidad de volumen.

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

Los cobayos a utilizarse en la prueba deben verificarse como no reactivos para Ac IHA contra PI-3 bovino. Los resultados del título de Ac IHA obtenidos a los 30 días post vacunación deberán expresarse como el  $\log_{10}$  de las UIHA a los fines de evaluar la vacuna.

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

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

El ensayo será válido siempre que los sueros de los cobayos inmunizados con la vacuna de referencia deben arrojar un título promedio dentro del rango establecido determinado por una carta de control que arroja el valor promedio  $\pm$  dos desvíos estándar obtenido de un mínimo de 5 pruebas.

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

Tabla 2. Título de Ac IHA anti PI-3

POCILLO Ultima Dilución que presenta IHA Titulo de la muestra (UIHA/25 ul)  
= dil \* 8 Titulo de la muestra (log10)

H	1	10	1
G	5	40	1,60
F	10	80	1,90
E	20	160	2,20
D	40	320	2,50
C	80	640	2,80
B	160	1280	3,10
A	320	2560	3,40

**Controles:**

**Control positivo cobayo:** Pool de sueros de 5 cobayos vacunados con dos dosis de vacuna conteniendo  $10^7$  DICT<sub>50</sub>/ml de PI-3 en adyuvante oleoso (Vacuna de Referencia) con un título de Ac s de 2.80.

**Control negativo cobayo:** Pool de sueros normales de cobayo (sueros de cobayos pre-inmunización o testigos no vacunados).

**Estándar positivo:** Suero de cobayo inmunizado, con título de Ac IHA conocido, preferentemente alto 3.10-3.40

**Estándar negativo:** Suero normal de cobayo.

**Los complementos dietarios son sustancias o mezcla de sustancias no medicamentosas, que se obtienen en forma sintética o natural y que se administran por la vía oral exclusivamente, con el fin de mejorar la fisiología y el bienestar de los animales.**

**Los complementos dietarios no pueden incluir indicaciones terapéuticas.**

**Cuando exista una dosis internacionalmente aceptada como terapéutica , la dosis indicada para el Complemento Dietario no podrá superar el 50 % de la misma.**

# ANEXO I

VALIDACIÓN ESTADÍSTICA

MODELO COBAYO INTA

POTENCIA DE VACUNAS PARA

EL VIRUS DE PARAINFLUENZA-3 BOVINO

## **Lista de abreviaturas**

PI-3: virus parainfluenza tipo 3 bovino

Mín-Máx: Valores mínimo y máximo, respectivamente.

SD: Desvío estándar.

LCI: Límite de confianza inferior bilateral al 95 %.

LCS: Límite de confianza superior bilateral al 95 %.

Título de Ac. : Título de Anticuerpos transformados a logaritmos

IHA: Inhibición de hemoaglutinación

UIHA: unidades inhibitorias de la hemoaglutinación

ANOVA: Análisis de varianza

Ag: Antígeno

dpv: días post vacunación



## EL ESTUDIO

- 
- Objetivos**
- 1. Ensayo dosis respuesta de vacunas contra Parainfluenza 3 bovino (PI-3)**
    - Capacidad discriminadora del modelo cobayo y la especie de destino (bovinos) para diferenciar vacunas oleosas formuladas con concentraciones crecientes de Ag de PI-3.
    - Estimar el tiempo óptimo de muestreo en bovinos y cobayos para realizar la comparación de parámetros serológicos entre el modelo y la especie de destino.
  - 2. Establecer un criterio de clasificación de vacunas comerciales en el modelo cobayo y los bovinos.**
  - 3. Análisis de Concordancia entre el bovino y el modelo cobayo para clasificar vacunas gold std de concentración conocida y vacunas comerciales, según los puntos de corte establecidos.**
- 

**1. Diseño** Estudio experimental. La selección aleatoria de los animales ensayados estuvo a cargo del grupo de investigación.

---

**2. Variables en estudio** Se evaluó el título de Ac por IHA para PI-3, a los 0, 30, 60 y 90 días dpv en bovinos y a los 0, 30 y 60 dpv en cobayos.

---

**2. Grupo de Investigación** Laboratorio VD, Instituto de Virología, CICV y A, INTA

---

**3. Período.** Los datos provienen de ensayos realizados durante 2004 – 2005- 2006 en el marco del CVT 1664 INTA-Biogénesis Bagó.  
Análisis estadístico basado en un informe previo realizado en 2006.  
Fecha de informe: Septiembre 2012.

---

**5. Número de animales** **Dosis respuesta:** 80 bovinos mayores de seis meses de edad y 90 cobayos de 450 a 550 gr de peso en grupos de 5.

**Concordancia:** 500 bovinos y 428 cobayos en grupos de 5 a 10, correspondientes a 74 vacunas comerciales y experimentales.

---

## Diseño Experimental, materiales y métodos

### Vacunas:

Se formularon dos sets vacunas oleosas, polivalentes conteniendo las valencias virales IBR, BVDV y dosis crecientes de antígeno de virus PI-3 bovino cepa de referencia SF4 (genotipo A). El rango de concentración viral utilizada en cada vacuna, varió en 1 o medio log<sub>10</sub> de diferencia entre cada vacuna. Cada set de 4 vacunas cada uno se evaluó en paralelo en bovinos y cobayos, en dos experimentos independientes según se detalla en la tabla 1.

**Tabla 1. Experimentos dosis respuesta en Bovinos y cobayos**

Set de vacunas	Set 1	Set 2
Ensayo a campo bovinos/	1.1 – 1.2	2.1 -2.2
Ensayo en cobayos		
año	2004	2005
<b>PI-3</b>	A Oleosa (10 <sup>8</sup> )	C Oleosa (10 <sup>7</sup> )*
Vacunas: concentración del	B Oleosa (5x10 <sup>7</sup> )	C Oleosa (10 <sup>7</sup> )*
antígeno expresada en	C Oleosa (10 <sup>7</sup> )	D Oleosa (10 <sup>6</sup> )
DICT50/dosis	D Oleosa (10 <sup>6</sup> )	E Oleosa (10 <sup>5</sup> )
	Placebo/testigos	Placebo/testigos

\*En el año 2005, set de vacunas 2, se probaron dos vacunas con 10<sup>7</sup> DICT<sub>50</sub>/dosis de PI-3

### Bovinos:

Es importante destacar que la infección por el virus de parainfluenza tipo 3 bovino es endémica en el ganado bovino a nivel mundial (Ellis, 2010) y que todos los terneros reciben anticuerpos calostrales anti-PI-3 que pueden persistir hasta los 6 meses de edad. Se estima que cuando los títulos de Ac calostrales disminuyen a valores inferiores a 1/32 (256 UIHA) los terneros se encuentran altamente susceptibles a sufrir la infección por PI-3, que pueden ser sintomática o no y rápidamente desarrollan anticuerpos frente al agente.

En función de lo expuesto, para realizar el ensayo dosis-respuesta propuesto se utilizaron terneros de cría de las razas angus, heresford y sus cruza, mayores de 6 meses de edad. Las experiencias se realizaron en las temporadas 2004 y 2005, (set 1.1: Exp 301.04-1, grupos de 5 animales, un evento; set 1.2: Exp 301.04-bis, grupos de 5 animales, un evento; set 2.1 y 2.2: Exp 546-05, 2 grupos de 5 animales para cada grupo, en dos eventos independientes;). En todos los casos se determinó el título de Ac basales contra PI-3 por IHA para armar los grupos con medias de Ac basales homogéneas. Los animales incluidos en el ensayo debían ser primo-vacunados con las vacunas bajo estudio. Los animales fueron vacunados con dos dosis de 3 ml de vacuna con un intervalo de 30 días y se tomaron muestras de suero a los 0, 30, 60 y 90 días post vacunación (dpv) (Figura 1a). Se incluyó un grupo placebo y un grupo de animales no vacunados como testigos. El estudio completo involucró 80 bovinos de cría.

### Cobayos

Por su parte, los cobayos de 400-500 gramos de peso fueron controlados para determinar que fueran seronegativos para Ac IHA contra PI-3 y luego fueron vacunados con dos dosis de vacuna de un volumen de dosis correspondiente a 1/5 de la dosis bovina, por vía parenteral, con un intervalo de 21 días, los animales se muestrearon a los 0, 30 y 60 dpv (Figura 1a y b). El estudio completo involucró 90 cobayos (Exp 500.2-05; 500.3-05; 255.1-04; 255.2-04).

### Análisis de muestras:

La respuesta inmune humoral frente a la vacunación con PI-3 se evaluó en el sueros de los animales vacunados mediante la técnica de inhibición de la hemoaglutinación de GR de cobayos según la metodología que se detalla en el Anexo II de esta guía.

Figura 1.a

Figura 1.b

**Análisis de datos:**

Con los resultados obtenidos se construyó una base de datos del **ensayo dosis-respuesta**. Todos los ensayos realizados en cobayos y bovinos generaron resultados procesables. De esta manera se obtuvieron 17 valores promedio de título de anticuerpos IHA para cada especie, correspondiente a grupos conformados por 5 cobayos y 5 bovinos, vacunados con las vacunas calibradoras formuladas con concentraciones crecientes de PI-3 que permitieron hacer el estudio de la cinética y magnitud de la respuesta de anticuerpos en cada especie, la capacidad discriminante del bovino y el modelo cobayo de diferenciar entre vacunas de diferente concentración antigénica de PI-3.

**Vacunas probadas para evaluar la concordancia entre el modelo y la especie destino:**

Para estudiar el grado de concordancia entre el modelo cobayo y los bovinos se analizaron un total de 71 casos que incluyeron las 17 vacunas oleosas calibradoras, elaboradas para realizar el ensayo dosis-respuesta, 16 grupos controles negativos que recibieron placebos o no fueron vacunados (testigos), 6 vacunas experimentales de potencia conocida (gold estándar), de las cuales una fue oleosa y cinco acuosas. Finalmente se incluyeron 32 vacunas comerciales, 18 acuosas y 14 oleosas (apéndice I, vacunas análisis de concordancia).

**Métodos Estadísticos:**

El análisis estadístico abordó básicamente la comparación de promedios del título de Ac. de distintos tiempos de muestreo en vacunas experimentales. Los datos de títulos de Ac IHA en cobayos y bovinos determinados a los 0, 30 y 60/90 dpv, respectivamente, fueron analizados mediante un modelo mixto de medidas repetidas (Littell, 1998). Las diferencias entre medias se probaron empleando el criterio de Bonferroni. Se empleó el criterio de Akaike para la selección de la matriz de covarianzas (Wolfinger & Chang, 1998). En los casos en que la interacción Vacuna\*Momento resultó significativa la comparación de medias se efectuó dentro de cada momento.

Para determinar los puntos de corte de clasificación de vacunas en ambas especies se empleó análisis de regresión y árbol de clasificación (Breiman, 1984). Brevemente para los títulos de Ac IHA anti-PI-3 inducido por las 17 vacunas calibradoras utilizadas en los ensayos dosis respuesta en cada especie (Cobayo y Bovino), se estimó el modelo lineal polinómico (de segundo grado), que mejor ajustara los datos. Para cada caso se informan los coeficientes de cada modelo ajustado, la significación del modelo, el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), los títulos estimados para las concentraciones de interés ( $10^5$  y  $10^7$  DICT<sub>50</sub>/dosis) y la estimación de los Límites Inferiores de los Intervalos de Predicción (LIP) para el título de Ac. esperado para dichas concentraciones. En cada caso se adjuntan también los gráficos de las curvas estimadas, con las correspondientes bandas de confianza y de predicción (del

Finalmente, para establecer el grado de concordancia entre el modelo cobayo INTA y bovino para clasificar vacunas de PI-3, según los puntos de corte establecidos, se analizaron las vacunas detalladas en el Apéndice 1 mediante el índice Kappa ponderado. Para cada especie (Bovino y Cobayo), se efectuó un análisis descriptivo, para evaluar promedios, medianas y medidas de variación, a través de las categorías propuestas. Se incluyen los Box & Whisker para visualizar el nivel de discriminación entre categorías. A partir de la aplicación simultánea del criterio de categorización en Bovinos y Cobayos, se generaron tablas de contingencia, para evaluar la concordancia entre ambos criterios. El nivel de concordancia fue evaluado mediante el índice KAPPA ponderado, acompañado de su SE asintótico y el intervalo de confianza del 95 % (Altman, 1991). En primer lugar, dicho índice fue estimado para el conjunto de vacunas de concentraciones conocida cuya información puede considerarse un Gold Standard, en este caso se evaluó la posible discrepancia con las predicciones efectuadas por cada modelo por separado. Luego se comparó la concordancia entre el modelo y la especie de destino y luego se completó en análisis incluyendo las vacunas comerciales. Valores de índice Kappa ponderado entre 0.41-0.60 indica concordancia moderada, valores de 0.61 a 0.80 indican concordancia sustancial o aceptable, mientras que valores mayores a 0.80 se considera concordancia casi perfecta (Viera and Garrett 2005).

## RESULTADOS

### 1-Ensayo Dosis respuesta Bovinos

- Evaluación de la inmunogenicidad y cinética de respuesta de anticuerpos IHA anti-PI-3 en bovinos vacunados**

Inicialmente se realizó un ensayo dosis respuesta que abarcó vacunas de concentración de Ag de PI-3 de  $10^8$  a  $10^6$  DICT<sub>50</sub>/dosis de PI-3. En este primer ensayo se evaluaron vacunas que diferían entre 1 y  $\frac{1}{2}$  logaritmo en su concentración antigénica. Todos los grupos de bovinos iniciaron la prueba con títulos basales de Ac contra PI-3 estadísticamente similares. El análisis de la cinética de respuesta de Ac IHA anti PI-3 en los bovinos vacunados con este 1º set de vacunas, probado en dos ensayos de campo en dos rodeos diferentes, indicó que las vacunas así formuladas fueron muy inmunogénicas. Los grupos vacunados seroconvieron para Ac IHA anti-PI-3 luego de una dosis a los 30 dpv y alcanzaron un título de Ac plateau que se mantuvo hasta los 90 dpv, diferenciándose estadísticamente del grupo control no vacunado o vacunado con placebo (Tabla 2; Figura 2).

Los bovinos no lograron discriminar entre vacunas que diferían en  $\frac{1}{2}$  o 1 log en su concentración antigénica en el rango de virus utilizado (Tabla 2), por lo que se decidió realizar un segundo experimento con una concentración menor de antígeno.

**Tabla 2. Set 1.1 + 1.2 (Exp 301-04/301bis-04).**

Vacuna	n	Momento de sangrado (días)			
		0	30	60	90
A Oleosa $10^8$	10	2.41 A	3.32 A*	3.38 A*	3.26 A*
B Oleosa $5 \times 10^7$	10	2.41 A	3.41 A*	3.41 A*	3.43 A*
C Oleosa $10^7$	10	2.51 A	3.23 A*	3.26 A*	3.28 A*
D Oleosa $10^6$	10	2.51 A	3.10 A*	2.98 A	3.26 A*
Testigos/Placebo	10	2.19 A	2.29 B	2.23 B	2.23 B

Nota: Los valores están expresados como medias aritméticas de los títulos de Ac.

Medias en **una misma columna** con diferente letra difieren significativamente.

Medias en la misma fila con asterisco indican diferencia significativa (seroconversión respecto del nivel de Ac basales).

La interacción Vacuna\*Momento fue significativa ( $p < 0.0001$ )

Figura 2. Cinética de respuesta de Ac anti-PI-3 en bovinos vacunados con vacunas oleosas con dosis crecientes de Ag. Dosis Rta set 1.1+1.2

En el segundo experimentos se preparó un nuevo set de vacunas que fue aplicada a dos grupos de bovinos, en dos ensayos independientes, en el mismo rodeo. En este caso, se prepararon dos vacunas con  $10^7$ , una vacuna con  $10^6$  y otra con  $10^5$  DICT<sub>50</sub> de PI-3/dosis. Nuevamente los bovinos iniciaron la experiencia con títulos de Ac basales estadísticamente similares y seroconvitieron para Ac IHA anti-PI-3 luego de una dosis (vacunas  $10^7$  y  $10^6$ ), alcanzando un plateau que se mantuvo hasta los 90 dpv. OPor su parte, la vacuna formulada con  $10^5$  de PI-3/dosis elevó levemente el titulo de Ac luego de 1 y 2 dosis de vacuna pero a niveles que no se consideran seroconversión. A los 60 días post vacunación los títulos de Ac promedio inducidos por la vacuna con concentración de Ag de  $10^5$  fue significativamente inferior a los de las vacunas con concentraciones superiores y a los 90 dpv los bovinos vacunados con esta vacuna retornaron su nivel basal de Ac contra PI-3.

Tal lo observado en el experimento anterior, a los 60 dpv, los bovinos no fueron capaces de discriminar entre vacunas que poseen  $10^6$  y  $10^7$  DICT<sub>50</sub> de Ag de PI-3, pero si diferenciaron entre estas dosis y vacunas conteniendo  $10^5$ .

La capacidad de discriminar significativamente entre vacunadas que difieren en 1 log10 recién se logra a los 90 días. Este segundo experimento permitió determinar que vacunas con concentraciones de Ag de  $10^5$  ya no serian inmunogénicas para indicar niveles de Ac detectables por la técnica de IHA (representando el limite de detección de la técnica) (Tabla 3; Figura 3).

**Tabla 3. Set 2.1 + 2.2 (Exp 546-05)**

Vacuna	n	Anticuerpos IHA anti-PI3 Tiempo (dpv)			
		0	30	60	90
C Oleosa $10^7$	10	1.87 A	3.23 A*	3.23 A*	3.14 AB*
C Oleosa $10^7$	10	1.99 A	3.31 A*	3.38 A*	3.28 A*
D Oleosa $10^6$	10	1.93 A	3.11 A*	3.28 A*	2.81 B
E Oleosa $10^5$	10	2.02 A	2.37 B	2.54 B	2.09 C
Placebo	10	1.87 A	2.02 B	1.98 C	1.87 C

Nota: Los valores están expresados como medias aritméticas de los títulos de Ac.

Medias en **una misma columna** con diferente letra difieren significativamente.

Medias en una misma fila con asterisco difieren significativamente del titulode Ac basal (seroconversión)

La interacción Vacuna\*Momento fue significativa ( $p < 0.0001$ )

**Figura 3. Cinética de la Respuesta de Ac IHA anti-PI-3 en Bovinos (EnsayoDosis Respuesta Set 2 ensayos 2.1 + 2.2)**

**Ensayo dosis respuesta en cobayos:**

**Estudio de la inmunogenicidad, cinética de respuesta de Ac y capacidad discriminante del modelo cobayo como prueba alternativa de potencia de vacunas de PI-3**

En la tabla 4 se detalla en análisis estadístico del total de grupos de cobayos inmunizados con cada vacuna, agrupadas por dosis de Ag. Los cobayos iniciaron la experiencia seronegativos para Ac IHA contra PI-3. Luego de dos dosis de vacunas (0 y 21 ds), todos los cobayos de los grupos vacunados con vacunas conteniendo  $10^8$ ,  $5 \times 10^7$ ;  $10^7$  y  $10^6$  DICT<sub>50</sub> de PI-3/dosis seroconvierten a los 30 dpv. Las vacunas que contiene  $10^7$  de virus o más presentan títulos significativamente mayores a los 30 dpv que las vacunas formuladas con  $10^6$ , que a su vez se diferencian de las vacunas  $10^5$  de virus, que prácticamente no inducen respuesta detectable por IHA. Sólo se detecta un aumento significativo del título de Ac. promedio al día 60 en la vacuna con concentración  $10^6$ . En esta vacuna, la diferencia media verdadera apenas supera, como máximo, medio logaritmo. La vacuna con  $10^5$  de virus, al igual que lo observado en bovinos, no logra generar seroconversión biológicamente relevante en los 4 lotes de cobayos vacunados (Tabla 4, Figura 4).

Del resultado obtenido en estos ensayos en cobayos, se concluye que la administración de dos dosis de vacuna con un intervalo de 21 ds entre dosis permite obtener una cinética y magnitud de respuesta de Ac anti PI-3 similar a la observada en los bovinos. Asimismo, el cobayo, probablemente por su condición de seronegativo, posee mayor poder discriminante que el bovino para evaluar la inmunogenicidad de vacunas para PI-3 siendo los 30 dpv el momento óptimo de toma de muestra para realizar la evaluación. El modelo cobayo, al igual que los bovinos, no seroconvierte para Ac IHA al recibir vacunas con  $10^5$  de Ag de PI-3 (límite de detección).

**Tabla 4. Ensayo dosis respuesta Cobayos:  
(Set 2.1 + 2.2 + Set 1.1 + 1.2)**

Vacuna	n	Momento de sangrado (días)			SD*
		0	30	60	
A Oleosa $10^8$	25	1.00	3.15 A	3.07 A	0.34
B Oleosa $5 \times 10^7$	9	1.00	3.28 A	3.08 A	0.30
C Oleosa $10^7$	30	1.00	2.97 A	3.08 A	0.31
D Oleosa $10^6$	19	1.00	2.00 B	2.77 A	0.71
E Oleosa $10^5$	10	1.00	1.00 C	1.45 B	0.68

\* Desvío estándar de la diferencia.

Figura 4. Título de Ac. promedio y Error Estándar de vacunas oleosas con distinta concentración antigénica. IHA para PI-3 en cobayos

Figura 5. Cinética de respuesta de Ac anti-PI-3 y estudio de la capacidad discriminante del modelo cobayo para distinguir entre vacunas con concentración viral creciente. (cada set de vacunas elaborado en dos años consecutivos, probados en dos lotes de cobayos de 5 animales cada uno).

**Tabla 5. Experimento 1.1 + 1.2 PI-3 IHA**

Vacuna	Momento de toma de muestra (dpv)		
	0	30	60
C Oleosa $10^7$	1.00	3.26 A	3.45 A
C Oleosa $10^7$	1.00	3.56 A	3.71 A
D Oleosa $10^6$	1.00	2.77 B	3.06 B
E Oleosa $10^5$	1.00	1.00 C	1.45 C
Placebo/ testigos	1.00	1.00	1.00

Nota: Los valores están expresados como medias aritméticas de los títulos de Ac. Medias en una misma columna con diferente letra difieren significativamente. La interacción Vacuna\*Momento no fue significativa ( $p=0.475$ ).

**Tabla 6. Experimento 2.1 + 2.2 - PI-3 IHA**

Vacuna	Momento de toma de muestra (dpv)		
	0	30	60
C Oleosa $10^7$	1.00	3.47 A	3.63 A
C Oleosa $10^7$	1.00	3.65 A	3.77 A
D Oleosa $10^6$	1.00	2.88 B	3.10 B



*Validación Estadística del Modelo Cobayo INTA para evaluar la potencia de vacunas contra la infección por el virus de Parainfluenza tipo 3 bovino*

E Oleosa 10 <sup>5</sup>	1.00	1.00 C	1.38 C
Placebo/testigos	1.00	1.00	1.00

Nota: Los valores están expresados como medias aritméticas de los títulos de Ac.  
Medias en una misma columna con diferente letra difieren significativamente.  
La interacción Vacuna\*Momento no fue significativa (p= 0.734).

### Conclusiones de los ensayos dosis respuesta en bovinos y cobayos

- El patrón de respuesta fue similar en ambas especies animales tanto para la Cinética de la respuesta de Ac como para la Magnitud de la respuesta de Ac IHA anti-PI-3. Las respuestas promedio del título de Ac. tendieron a aumentar con las concentraciones crecientes de Ag en bovinos y cobayos. Se observó una relación directamente proporcional entre la Respuesta de Ac y la concentración de Ag en ambas especies, evidenciando un claro efecto dosis respuesta. Sin embargo la capacidad de discriminación de los bovinos entre vacunas de diferente concentración antigénica solo permite diferenciar vacunas de menos de 10<sup>6</sup> de Ag de PI-3 por dosis de vacunas con concentraciones de Ag de 10<sup>6</sup> o mayores.
- **La prueba en cobayo demostró mayor capacidad discriminante que el bovino, dado que discriminó significativamente entre vacunas oleosas formuladas con títulos de Ag de 10<sup>5</sup>; 10<sup>6</sup> y títulos de 10<sup>7</sup> o mayores.**
- El título de Ac IHA a los 30 días resulta más discriminante en la detección de vacunas de baja concentración de antígenos (D y E), ya que a los 60 días, el título de Ac. se elevó significativamente, en estas vacunas. Esto indicaría que **la medición a los 30 días se puede considerar como el punto óptimo para finalizar la prueba en cobayos**, resultando una prueba económica y rápida para evaluar la potencia de vacunas para PI-3.

### 2- **Análisis de regresión y estimación de puntos de corte para la clasificación de vacunas para PI-3 en bovinos y cobayos**

El análisis de regresión de los datos obtenidos a partir de los ensayos dosis respuesta en bovinos y cobayos en la Para establecer los puntos de corte para discriminar vacunas de diferente potencia se ilustra en la figura 6. Para ambas especies el modelo matemático que mejor ajustó a los datos fue un modelo lineal polinómico de 2º grado. El modelo permitió predecir los títulos de Ac IHA promedios inducidos por las vacunas con un 85% de ajuste para cobayos y un 81% de ajuste en bovinos. La F reportada y su valor p corresponden a la significación del modelo (Figura 6).

Figura 6. Análisis de Regresión a partir del cual se estiman los puntos de corte para clasificar vacunas de diferente calidad inmunogenica en bovinos y cobayos. Cada punto representa el promedio del log10 de los títulos de Ac inhibidores de la hemoaglutinación anti-PI-3, obtenido en grupos de 5 cobayos/bovinos vacunados con vacunas oleosas con concentraciones crecientes de Ag de PI-3. Se ilustra la curva estimada por el modelo acompañada las bandas correspondientes a los intervalos de confianza y predicción del 90%.

En la tabla 7 se detallan los límites de predicción obtenidos a partir del modelo matemático en bovinos y cobayos. El límite inferior del intervalo de predicción del 90% representa el valor mínimo de Ac IHA promedio que debe inducir una vacuna para cada concentración de Ag en la formulación cuando es administrada a un grupo de un mínimo de 5 cobayos o 5 bovinos, con un 95% de confianza (coverage). Dado que tanto el modelo como la especie de destino fueron capaces de discriminar entre vacunas formuladas con una concentración de  $10^6$  de Ag de PI-3 o mayor de vacunas con concentraciones inferiores, el punto de corte para declarar una vacuna como de calidad **mínima aceptable** fue el correspondiente al límite de predicción del 90% para dicha concentración antigénica estimado en un título mínimo de 2.8 para bovinos y 1.5 para cobayos. Adicionalmente, aquellas vacunas con concentraciones de antígeno  $\geq 10^7$  DICT<sub>50</sub>/dosis o mayores deben arrojar títulos promedios de Ac no menor a 3.1 en bovinos y 2.4 en cobayos.

**Tabla 6. Límites de predicción del 90% estimados a partir del análisis de regresión**

Set. Exp	VACUNA	Conc. PI-3 (log10 DICT50/dosis)	Bov T0	Bov T60	Cobayo T30	IPRE(LI) Bov T60	IPRE(LS) Bov T60	IPRE(LI) CobT30	IPRE(LS) Cob T30
1,1	A	8	2,69	3,41	3,59	3,05	3,67	2,67	4,46
1,1	B	7,7	2,32	3,41	3,41	3,09	3,67	2,67	4,34
1,1	C	7	2,38	3,29	3,18	3,05	3,62	2,39	4,02
1,1	C	7	2,26	3,35	3,18	3,05	3,62	2,39	4,02
1,1	D	6	2,44	3,11	1,48	2,8	3,37	1,52	3,17
1,2	A	8	2,14	3,35	3,71	3,05	3,67	2,67	4,46
1,2	B	7,7	2,51	3,41	3,17	3,09	3,67	2,67	4,34

Validación Estadística del Modelo Cobayo INTA para evaluar la potencia de vacunas contra la infección por el virus de Parainfluenza tipo 3 bovino

1,2	C	7	2,63	3,23	2,93	3,05	3,62	2,39	4,02
1,2	D	6	2,57	2,87	2,02	2,8	3,37	1,52	3,17
2,1	C	7	2,08	3,17	3,47	3,05	3,62	2,39	4,02
2,2	C	7	1,66	3,29	3,05	3,05	3,62	2,39	4,02
2,1	C	7	2,26	3,41	3,65	3,05	3,62	2,39	4,02
2,2	C	7	1,72	3,35	3,47	3,05	3,62	2,39	4,02
2,1	D	6	2,14	3,41	2,88	2,8	3,37	1,52	3,17
2,2	D	6	1,72	3,17	2,69	2,8	3,37	1,52	3,17
2,1	E	5	2,2	2,63	1	2,28	2,93	0,02	1,89
2,2	E	5	1,84	2,51	1	2,28	2,93	0,02	1,89

Tabla 7. Criterio de clasificación del Título de Ac. estimado a partir del modelo Cobayo y la especie de destino

Especie	Criterio de Clasificación Título de Ac IHA antiPI-3		
	Potencia Baja Menor a $10^6$	Media Entre $10^6$ y $10^7$	Alta $10^7$ o mayor
<b>BOVINO</b>	< 2.8	[2.8 a 3.1)	$\geq 3.1$
<b>cobayo</b>	< 1.5	[1.5 a 2.4)	$\geq 2.4$

### Conclusiones del análisis de regresión y estimación de puntos de corte para clasificar vacunas

- Como criterio de clasificación se pueden establecer límites del título de Ac. en cobayos para identificar la concentración antigénica de las vacunas comerciales. Para el caso de los títulos de Ac. para PI-3 medidos por IHA, el criterio sería calificar como de alta inmunogenicidad una vacuna con títulos superiores a 2.4 en cobayos (3.1 en bovinos) y vacunas de baja inmunogenicidad si el título alcanzado en promedio no supera 1.5. Valores intermedios indicarían que la vacuna posee bajos títulos de antígeno de PI-3 pero que podría ser inmunogénica en animales ya primados, considerándose de calidad inmunogénica intermedia.
- Es importante destacar que títulos de Ac IHA de 1/32 (en nuestro método con un título en UIHA =  $32 * 8 = 256$ ; expresado en  $\log_{10} = 2.4$ ) se considera el umbral mínimo (threshold) de anticuerpos colostrales que deben poseer los terneros para estar protegidos frente a la infección por PI-3 (Ellis, 2010).
- El licenciamiento de vacunas para PI-3 en Norteamérica requiere que la vacuna induzca en los bovinos al menos un incremento del título de Ac neutralizantes en suero de una dilución 1:4 postvacunación y una reducción significativa de títulos viral excretado en secreciones nasales en comparación con controles no vacunados. No se requiere reducción de enfermedad (CFR).

### 3- Estudio de concordancia entre los bovinos y el modelo cobayo para clasificar vacunas para PI-3

El estudio de concordancia se realizó inicialmente con un único punto de corte que diferencia vacunas satisfactorias de no satisfactorias (1.5 cobayos; 2.8 bovinos). El grado de concordancia del modelo cobayo y la especie de destino utilizando 39 líneas de comparación (17 vacunas formuladas para el ensayo dosis-rta, 6 vacunas gold standard de concentración de Ag conocida y 16 controles negativos) fue casi perfecto (Kappa ponderado = 0.898). Solo dos vacunas fueron clasificadas como no satisfactorias por el bovino y satisfactorias por el modelo cobayo. Ambas vacunas corresponden a formulaciones acuosas con  $10^7$  DICT50/dosis que fueron correctamente clasificadas por los cobayos.

Tabla 8. Concordancia entre el bovino y el cobayo. Vacunas Gold Standard

Cobayos (1.5)	Bovinos (2.8)		
	No satisfactoria	Satisfactoria	
No satisfactoria	19	0	19 (48,7%)
Satisfactoria	2	18	20 (51,3%)
	21 -53,80%	18 -46,20%	39
Weighted Kappa <sup>a</sup>	0,898		
Standard error	0,07		
95% CI	0,760 to 1,000		

Si al análisis se incorporan 32 vacunas comerciales de concentración de PI-3 desconocida se obtiene un grado de concordancia óptimo o sustancial (Kappa ponderado = 0.777). Registrándose sólo 8 discordancias sobre un total de 71 comparaciones.

Tabla 9. Concordancia vacunas comerciales y gold std

Cobayo (1.5)	Bovino (2.8)		
	No satisfactoria	Satisfactoria	
No satisfactoria	33	0	33 (46,5%)
Satisfactoria	8	30	38 (53,5%)
	41 (57,7%)	30 (42,3%)	71
Weighted Kappa <sup>a</sup>			0,777
Standard error			0,072
95% CI			0,635 to 0,919

Finalmente si se consideran los dos puntos de corte par discriminar entre vacunas de calidad intermedia de muy buenas, se obtiene un grado de concordancia también muy bueno

Tabla 10. Concordancia considerando dos puntos de corte

Cobayo	Bovino			
	Baja	Intermedia	Satisfactoria	
Baja	34	0	0	34 (47,9%)
Intermedia	4	7	2	13 (18,3%)
Muy satisfactoria	3	4	17	24 (33,8%)
	41 (57,7%)	11 (15,5%)	19 (26,8%)	71
Weighted Kappa <sup>a</sup>				0,757
Standard error				0,064
95% CI				0,632 to 0,882

**Apéndice I. Vacunas utilizadas en el análisis de concordancia**

Nº línea	Tipo de Vacuna	Aplicación VACUNA	SERIE	FORM	Composición (Ag virales)	Ag PI-3	PI3IHABov 0	PI3IHABov 60	PI3IHACob 30
1	DOSISRTA	Calibracion experimental	A	OLEOSA	IBR- BVDV -PI-3	8,00	2,08	3,17	3,47
2	DOSISRTA	Calibracion experimental	A	OLEOSA	IBR- BVDV -PI-3	8,00	1,66	3,29	3,05
3	DOSISRTA	Calibracion experimental	C	OLEOSA	IBR- BVDV -PI-3	7,00	2,26	3,41	3,65
4	DOSISRTA	Calibracion experimental	C	OLEOSA	IBR- BVDV -PI-3	7,00	1,72	3,35	3,47
5	DOSISRTA	Calibracion experimental	D	OLEOSA	IBR- BVDV -PI-3	6,00	2,14	3,41	2,88
6	DOSISRTA	Calibracion experimental	D	OLEOSA	IBR- BVDV -PI-3	6,00	1,72	3,17	2,69
7	DOSISRTA	Calibracion experimental	E	OLEOSA	IBR- BVDV -PI-3	5,00	2,20	2,63	1,00
8	DOSISRTA	Calibracion experimental	E	OLEOSA	IBR- BVDV -PI-3	5,00	1,84	2,51	1,00
42	DOSISRTA	Calibracion experimental	A	OLEOSA	IBR- BVDV -PI-3	8,00	2,14	3,35	3,71
43	DOSISRTA	Calibracion experimental	B	OLEOSA	IBR- BVDV -PI-3	7,70	2,51	3,41	3,17
44	DOSISRTA	Calibracion experimental	C	OLEOSA	IBR- BVDV -PI-3	7,00	2,63	3,23	2,93
45	DOSISRTA	Calibracion experimental	D	OLEOSA	IBR- BVDV -PI-3	6,00	2,57	2,87	2,02
47	DOSISRTA	Calibracion experimental	A	OLEOSA	IBR- BVDV -PI-3	8,00	2,69	3,41	3,59
49	DOSISRTA	Calibracion experimental	B	OLEOSA	IBR- BVDV -PI-3	7,70	2,32	3,41	3,41
50	DOSISRTA	Calibracion experimental	C	OLEOSA	IBR- BVDV -PI-3	7,00	2,38	3,29	3,18
51	DOSISRTA	Calibracion experimental	C	OLEOSA	IBR- BVDV -PI-3	7,00	2,26	3,35	3,18
54	DOSISRTA	Calibracion experimental	D	OLEOSA	IBR- BVDV -PI-3	6,00	2,44	3,11	1,50
20	GOLD STANDARD	Concentracion PI-3 conocida		ACUOSA	IBR- BVDV -PI-3	7,00	2,26	3,28	2,44
27	GOLD STANDARD	Concentracion PI-3 conocida		OLEOSA	IBR- BVDV -PI-3	7,00	2,62	2,56	1,42
48	GOLD STANDARD	Concentracion PI-3 conocida	A	ACUOSA	IBR- BVDV -PI-3	8,00	2,32	3,35	2,93
52	GOLD STANDARD	Concentracion PI-3 conocida	C	ACUOSA	IBR- BVDV -PI-3	7,00	2,32	2,81	1,56
53	GOLD STANDARD	Concentracion PI-3 conocida	C	ACPLUS	IBR- BVDV -PI-3	7,00	2,51	2,75	2,40
63	GOLD STANDARD	Concentracion PI-3 conocida		ACUOSA	IBR- BVDV -PI-3	7,00	1,54	2,26	2,44
9	CONTROL	Testigos/placebos		OLEOSA		0,00	1,96	2,02	1,00
10	CONTROL	Testigos/placebos		OLEOSA		0,00	1,70	1,90	1,00
46	CONTROL	Testigos/placebos		OLEOSA		0,00	2,31	2,20	1,00
55	CONTROL	Testigos/placebos		OLEOSA		0,00	2,08	2,26	1,00
19	CONTROL	Testigos no vacunados					2,38	2,50	1,00
24	CONTROL	Testigos no vacunados					2,10	2,20	1,00

*Validación Estadística del Modelo Cobayo INTA para evaluar la potencia de vacunas contra la infección por el virus de Parainfluenza tipo 3 bovino*

Nº línea	Tipo de Vacuna	Aplicación VACUNA	SERIE	FORM	Composición (Ag virales)	Ag PI-3	PI3IHABov 0	PI3IHABov 60	PI3IHACob 30
29	CONTROL	Testigos no vacunados					2,68	2,38	1,00
35	CONTROL	Testigos no vacunados					2,75	2,75	1,00
41	CONTROL	Testigos no vacunados					2,75	2,75	1,00
59	CONTROL	Testigos no vacunados					2,14	1,96	1,00
62	CONTROL	Testigos no vacunados					1,75	1,65	1,00
64	CONTROL	Testigos no vacunados					1,69	1,74	1,00
69	CONTROL	Testigos no vacunados					1,42	1,12	1,00
72	CONTROL	Testigos no vacunados					1,72	1,45	1,00
77	CONTROL	Testigos no vacunados					2,57	2,38	1,00
78	CONTROL	Testigos no vacunados					2,38	2,2	1,00
21	COMERCIAL	Síndrome respiratorio	33	ACUOSA	IBR- BVDV -PI-3		2,17	3,10	1,84
22	COMERCIAL	Multi proposito	21	OLEOSA	IBR- BVDV -PI-3 - RV		2,07	2,83	2,26
23	COMERCIAL	Pre-servicio	9	OLEDE	IBR- BVDV -PI-3		2,11	2,53	1,36
25	COMERCIAL	Multi proposito	20	OLEOSA	IBR- BVDV -PI-3 - RV		2,20	2,80	2,32
26	COMERCIAL	Queratoconjuntivitis	26	OLEOSA	IBR		2,38	2,26	1,00
28	COMERCIAL	Pre-servicio	9	OLEDE	IBR- BVDV -PI-3		1,96	2,20	1,00
30	COMERCIAL	Multi proposito	19	OLEOSA	IBR- BVDV -PI-3 - RV		2,38	3,17	2,75
31	COMERCIAL	Síndrome respiratorio	4	OLEDE	IBR- BVDV -PI-3		2,32	2,62	1,90
32	COMERCIAL	Síndrome respiratorio	5	OLEOSA	IBR- BVDV -PI-3		2,38	2,99	2,99
33	COMERCIAL	Síndrome respiratorio	1	ACUOSA	IBR - BVDV - PI-3 - BRSV		2,44	2,05	2,38
34	COMERCIAL	Pneumonia	6	OLEOSA	PI-3		2,38	2,99	2,93
36	COMERCIAL	Multi proposito	19	OLEOSA	IBR- BVDV -PI-3 - RV		2,38	3,17	2,87
37	COMERCIAL	Síndrome respiratorio	4	OLEDE	IBR- BVDV -PI-3		2,32	2,62	2,43
38	COMERCIAL	Síndrome respiratorio	5	OLEOSA	IBR - BVDV - PI-3 - BRSV		2,38	2,99	2,99
39	COMERCIAL	Síndrome respiratorio	1	ACUOSA	IBR - BVDV - PI-3 - BRSV		2,44	2,05	2,38
40	COMERCIAL	Pneumonia	6	OLEOSA	IBR- BVDV -PI-3		2,38	2,99	3,25
56	COMERCIAL	Síndrome respiratorio	32	ACUOSA	IBR- BVDV -PI-3		1,90	2,57	2,38
60	COMERCIAL	Síndrome respiratorio	45	ACUOSA	IBR- BVDV -PI-3			2,03	1,00
61	COMERCIAL	Síndrome respiratorio	31	ACUOSA	IBR- BVDV -PI-3		1,95	2,12	1,45
67	COMERCIAL	Síndrome respiratorio	236-152	ACUOSA	IBR- BVDV -PI-3		1,45	1,21	1,00
68	COMERCIAL	Síndrome respiratorio	2	OLEDE	IBR- BVDV -PI-3		1,21	1,12	1,00
70	COMERCIAL	Síndrome respiratorio	18	ACUOSA	IBR- BVDV -PI-3		1,69	2,14	2,51

*Validación Estadística del Modelo Cobayo INTA para evaluar la potencia de vacunas contra la infección por el virus de Parainfluenza tipo 3 bovino*

---

Nº línea	Tipo de Vacuna	Aplicación VACUNA	SERIE	FORM	Composición (Ag virales)	Ag PI-3	PI3IHABov 0	PI3IHABov 60	PI3IHACob 30
71	COMERCIAL	Síndrome respiratorio	32	ACUOSA	IBR- BVDV -PI-3			1,60	1,00
73	COMERCIAL	Síndrome respiratorio	58	ACUOSA	IBR- BVDV -PI-3		2,07	2,39	1,30
74	COMERCIAL	Síndrome respiratorio	58	ACUOSA	IBR- BVDV -PI-3		2,07	2,39	1,00
75	COMERCIAL	Síndrome respiratorio	2	ACUOSA	IBR- BVDV -PI-3		1,90	2,43	1,00
76	COMERCIAL	Síndrome respiratorio	2	ACUOSA	IBR- BVDV -PI-3		2,13	2,38	1,34
79	COMERCIAL	Síndrome respiratorio		ACUOSA	IBR - BVDV - PI-3 - BRSV		2,51	2,88	1,53
80	COMERCIAL	Síndrome reproductivo		ACUOSA	IBR- BVDV		2,66	2,66	1,24
81	COMERCIAL	Síndrome respiratorio	1	ACUOSA	IBR - BVDV - PI-3 - BRSV		2,73	2,88	1,54
82	COMERCIAL	Síndrom respiratorio	2	ACUOSA	IBR - BVDV - PI-3 - BRSV		2,51	2,81	1,72
83	COMERCIAL	Síndrom respiratorio	3	ACUOSA	IBR - BVDV - PI-3 - BRSV		2,51	2,61	1,48

**C A M E V E T**  
**Cod:000**  
**TRÁMITE: III**  
**FECHA: Agosto de 2014**

**SEGURIDAD DE VACUNAS EN BOVINOS**  
**Guía para estudios con vacunas inactivadas.**

---

**REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.**

Paseo Colón 315, 5to. Piso "D" (C1063ACD), Buenos Aires, Argentina

Tel: (54-11) 4331-3919 / 5158 - Fax: (54-11) 4331-5162

e-mail: [rr.americas@oie.int](mailto:rr.americas@oie.int) Web: <http://www.rr.americas.oie.int>



## 1. INTRODUCCIÓN

Las vacunas inactivadas que se aplican en bovinos constan básicamente de un componente antigénico: virus y/o bacterias completos, subunidades de los mismos, toxoides en forma monovalente ó combinada y un componente de efecto adyuvante (diversos principios en solución acuosa ó emulsiones ). A diferencia de los medicamentos farmacéuticos, la Fórmula Patrón de las vacunas no es completamente definible, debido a la compleja composición de virus y bacterias. Por otra parte, los ensayos de potencia normatizados para diversas vacunas bacterianas (Leptospirosis, Clostridiosis, Pasteurelisis, etc. ) se efectúan mediante desafío en animales de laboratorio, por lo cual durante el desarrollo de tales vacunas es factible que no se hayan probado en bovinos. Por los motivos antes enunciados, la prueba de seguridad en bovinos adecuadamente registrada es una instancia ineludible para cada nueva vacuna que se presente para solicitar registro ó licencia.

El continuo avance en la armonización de estándares internacionales permite disminuir las repeticiones de los estudios de seguridad en la especie de destino, evitando efectuar el mismo estudio en varios países. De este modo, no solamente se reducen los costos de investigación sino el número de animales involucrados, contemplando los principios de bienestar animal.

Esta guía fue elaborada en base a normas vigentes tanto en América como en la Unión Europea, con la intención de proporcionar conceptos unificados que permitan la aceptación de los datos de seguridad por parte de la autoridades regulatorias.

## 2. OBJETIVO

El objetivo de la guía es proporcionar recomendaciones para la realización de estudios para evaluar la seguridad de las formulaciones finales de vacunas inactivadas para bovinos y aplica a lotes a escala de laboratorio (vacunas experimentales), escala piloto y vacunas para registro, reunidas en la sigla LPR.

## 3. ALCANCE

El marco de aplicación de la guía se limita a evaluaciones del estado de salud y bienestar de los bovinos, a los cuales se les aplica un protocolo de vacunación acorde con las indicaciones de conservación y administración indicadas por el elaborador. Las recomendaciones de la guía se dirigen a los laboratorios elaboradores de vacunas inactivadas para bovinos, para las etapas de desarrollo y lotes piloto previos a la solicitud de licencia del producto, así como evaluaciones de producto terminado que sean requeridas oportunamente. Las recomendaciones de esta guía no alcanzan a los controles de seguridad de las vacunas vesiculares, las cuales se rigen por normas específicas. El alcance de la guía no se aplican a los estudios de seguridad para liberación de series comerciales de vacunas inactivadas no-vesiculares, los cuales se efectúan en animales de laboratorio (9.CFR ,113.33 y 113.38, o eventualmente con una prueba de seguridad con sobredosis en 2 terneros, (9.CFR 113, 41), en caso de requerimiento específico por el organismo regulatorio. La tendencia actual para la liberación de series de las vacunas autorizadas es la reducción de pruebas en animales, reemplazadas por la demostración documental de consistencia de manufactura en paralelo con estudios en bovinos (VICH. GL 50)

## 4. TERMINOS Y DEFINICIONES

- ❖ **Seguridad.-** En esta guía el término seguridad (en inglés *safety*) se emplea como sinónimo de **inocuidad**, término definido en el Glosario de CAMEVET como: “*Propiedad de un producto veterinario que indica que su correcta administración a la especie que se lo destina no determinará la presentación de efectos adversos en una proporción estadísticamente significativa*”. En algunos documentos de países de habla hispana se emplea también el término **tolerancia**, con el mismo significado (MAPA Brasil, 2008 y SENASA, Argentina, 2006), mientras que en otros países ese término tiene otro significado.
- ❖ **Efecto adverso:** Cualquier observación desfavorable que se sospeche esté relacionada con la LPR en cuestión.
- ❖ **Lote Piloto:** Lote de una vacuna elaborado a través de un procedimiento representativo del que se aplicará a escala industrial. Los métodos de elaboración deben ser idénticos, excepto por la escala de producción.
- ❖ **Dosificación:** Volumen , número e intervalo entre las dosis.
- ❖ **Categoría:** Subgrupo de bovinos que tienen en común características como edad, estado reproductivo y tipo de producción (terneros/as, vaquillonas, vacas lecheras, novillos, toros, etc.)
- ❖ **Lote de producción:** Lote de vacuna elaborado en las instalaciones de producción donde realmente se elaborará a través del método descrito en la solicitud de registro.
- ❖ **Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL).-** Aplicación de procedimientos estandarizados para el diseño, realización, toma de datos, , análisis e informe de estudios no clínicos. El cumplimiento de los procedimientos estandarizados garantiza que los datos y los resultados informados sean completos, correctos y precisos.
- ❖ **Buenas Prácticas Clínicas (BPC).-** Aplicación de procedimientos estandarizados para el diseño, captura de datos, análisis de los mismos e informe de estudios clínicos. El cumplimiento e los procedimientos estandarizados garantiza que los datos y los resultados informados sean completos, correctos y precisos.
- ❖ **Estudio de seguridad de laboratorio:** Estudio clínico realizado con las LPR bajo condiciones controladas, siguiendo las indicaciones del elaborador para demostrar seguridad en bovinos. Se realizan antes de los estudios de seguridad a campo.
- ❖ **Estudio de seguridad a campo:** Estudio clínico realizado con la vacuna en condiciones reales de utilización y siguiendo las indicaciones del elaborador para demostrar seguridad en bovinos. .
- ❖ **Control Negativo:** Animales sanos no tratados o que son inoculados con placebo.

- ❖ **Estudio a ciegas:** Procedimiento en el cual el personal designado para el estudio desconoce la asignación al tratamiento, a fin de reducir posibles sesgos en el estudio.
- ❖ **Evento adverso:** Cualquier observación desfavorable y no intencionada que ocurre luego del uso de una LPR, se considere o no relacionada al producto.
- ❖ **Protocolo:** Documento que describe exhaustivamente el (los) objetivo(s), diseño, metodología, consideraciones estadísticas y organización de un estudio. El documento es firmado y fechado por todos los responsables que intervienen en el ensayo. . El protocolo también puede proporcionar los antecedentes y fundamentos del estudio, si bien pero éstos pueden estar disponibles en otros documentos, que son referenciados en el protocolo del estudio. El término incluye todas las enmiendas al mismo.

## 5. RECOMENDACIONES GENERALES

Para la planificación de los estudios de seguridad de vacunas en bovinos, deben tenerse en cuenta la información disponible, tal como el tipo de vacuna, naturaleza de los adyuvantes, excipientes, dosis y régimen propuesto, información contenida en la etiqueta, antecedentes de uso previo de productos similares, categoría de destino y raza. Y todo dato sobre seguridad que se haya registrado durante las etapas de desarrollo del producto.

Los datos mencionados son importantes para sustentar el diseño de los estudios de seguridad, definiendo los parámetros críticos que deben ser evaluados.

Se acepta que los datos sobre estudios de seguridad con vacunas combinadas pueden utilizarse para demostrar la seguridad de vacunas del mismo elaborador que contengan menor cantidad y/o concentración de fracciones antigénicas, siempre y cuando los componentes restantes (antígenos, adyuvantes o excipientes) sean idénticos en cada caso y sea sólo la cantidad de antígenos lo que disminuye en una formulación ulterior.

Los eventos adversos deben describirse e incluirse en el informe final intentando determinar la causalidad de los mismos.

La información sobre la seguridad de vacunas inactivadas que son sometidas a pruebas de desafío en la especie de destino, puede obtenerse registrando las observaciones clínicas individuales efectuadas post-vacunación y antes de efectuar el desafío experimental( OIE 2009).

## 6. GUIA PARA LA EJECUCIÓN DE LOS ESTUDIOS

Los procedimientos recomendados a continuación, refieren a Estudios de Seguridad de Laboratorio Estudios de Seguridad de Campo y Estudios de

Seguridad Reproductiva.

## 6.a) PROCEDIMIENTOS ESTÁNDAR

Los estudios de seguridad en bovinos deben realizarse y dirigirse de conformidad con los principios de Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL), Buenas Prácticas Clínicas (BPC) y normas de bienestar animal, internacionalmente aceptadas.

## 6.b) ESTUDIOS DE SEGURIDAD DE LABORATORIO

Los estudios de seguridad de laboratorio constituyen la primera etapa en la evaluación del atributo de seguridad y proporcionan información básica para la segunda etapa, los estudios de campo.

Se deben utilizar animales de edad, sexo y categoría para los cuales la vacuna es recomendada. Los animales tratados y los animales de control negativo deben ser sometidos al mismo manejo y a las mismas condiciones ambientales. Todos los animales deben poseer identificación individual inequívoca.

Los estudios deben realizarse con 3 lotes de las LPR. A lo menos 1 de los lotes deberá estar formulado con la concentración antigénica máxima declarada o, en caso de que no esté especificada se puede emplear un múltiplo de la concentración antigénica mínima.

Las instalaciones deben ser adecuadas para el propósito del estudio y cumplir con las normas locales de bienestar animal. Se recomienda el ingreso de los animales al lugar del estudio con una semana de antelación para su aclimatación. Cualquier tratamiento sanitario debe realizarse y registrarse antes del inicio del estudio. Es esencial reducir o eliminar el sufrimiento durante el ensayo. Se recomienda la eutanasia y necropsia de los animales moribundos.

Los parámetros esenciales que deben ser evaluados para evaluar la seguridad son: observación clínica de los animales, reacciones locales y sistémicas atribuibles a la vacuna y su resolución, así como los efectos de la vacuna sobre la reproducción, cuando corresponda. Evaluar y registrar las observaciones en forma individual y tanto en animales vacunados como en los controles negativos.

El protocolo del estudio deberá ser detallado e incluir las planillas adecuadas para la captura de datos.

Pueden requerirse estudios complementarios, como hemogramas, química sanguínea, necropsia o examen histológico. Cuando esos estudios se realicen en un subgrupo de animales, esos animales deben ser seleccionados aleatoriamente con un tamaño de muestra adecuado antes del inicio del estudio para evitar sesgos, a menos que se justifique lo contrario. Las muestras deben seleccionarse apropiadamente a fin de que, en caso de presentarse reacciones o resultados inesperados, pueda determinarse la causa del problema observado.

El personal involucrado en los estudios, deben desconocer la asignación de los grupos en ensayo para minimizar sesgos.

El protocolo de trabajo variará según corresponda.

- Estudios con dosis única o con dosis repetidas

Para aquellas vacunas cuya indicación es la primovacuna seguida por una dosis de refuerzo (2ª dosis), se aplicará el intervalo más corto del régimen de vacunación recomendado por el elaborador. Por razones de practicidad, se puede reducir ese intervalo hasta no menos de 14 días.

En general, a menos que se justifique otra alternativa, se deben usar 8 animales por grupo. Se debe utilizar la categoría, edad y sexo más sensible propuesto en la etiqueta.

Si se especifican múltiples vías y métodos de administración para el producto en cuestión, los estudios deben realizarse para cada una de las vías recomendadas. Si una vía de administración ha demostrado causar los efectos más serios, se puede seleccionar sólo esa vía para el estudio.

- Estudios con sobredosis

Cuando se considere pertinente, se llevará a cabo la aplicación de una sobredosis de vacuna, por cada una de las vías indicadas y en la categoría más susceptible entre las indicadas por el elaborador. Para el caso de las vacunas inactivadas, se establece como estudio de sobredosis a la administración del doble de la dosis indicada, en una aplicación (E.P. 7.0, 2013)

- Recolección de datos

Se deben realizar observaciones clínicas diarias durante 14 días post-vacunación, tratando de respetar el mismo horario de observación. Además, se deben registrar observaciones clínicas y criterios relevantes, como temperatura rectal o medición del desempeño (ganancia de peso diaria, producción láctea y otros), durante ese período de observación con la frecuencia correspondiente. Se deben examinar los sitios de inyección a diario o a intervalos justificables, por medio de inspección, palpación y medición, hasta como mínimo 14 días después de la administración de la LPR en estudio. Cuando se presenten reacciones adversas en el sitio de inyección al término de los 14 días, el período de observación se extenderá hasta alcanzar una resolución aceptable de la lesión o, si correspondiera, hasta que el animal sea sacrificado y se realice un examen histopatológico.

Siempre que se cuente con antecedentes de vacunas similares, es conveniente fijar criterios de aceptación (hipertermia hasta determinado tiempo, tamaño aceptable de reacciones locales, etc.). Al momento de diseñar las planillas de registro es conveniente prever la anotación sobre la duración de las eventuales reacciones sistémicas y locales así como el modo de resolución de estas últimas.

- Análisis estadístico

En los estudios de laboratorio, los resultados sobre seguridad son mejor abordados aplicando estadística descriptiva a los datos. Las tablas y textos

descriptivos son métodos comunes para resumir los datos; sin embargo, también pueden resultar útiles las presentaciones gráficas en las que se visualizan los eventos adversos tanto dentro del tratamiento como entre individuos. Cualquiera fuera el método elegido, se debe describir el proceso y los pasos seguidos para realizar cualquier evaluación estadística. Los resultados de los análisis de los datos deben presentarse con claridad para facilitar la identificación de problemas de seguridad potenciales. La terminología y los métodos de presentación deben elegirse para clarificar los resultados y agilizar la interpretación.

Aún cuando puede resultar interesante el enfoque de la hipótesis nula de no-diferencia entre grupo tratado y grupo no tratado, el diseño del estudio restringe el poder estadístico y la capacidad discriminadora de esos estudios. Bajo tales condiciones, el análisis estadístico sólo, puede resultar insuficiente para detectar efectos adversos potenciales y ofrecer conclusiones de seguridad garantizada. Un ensayo estadísticamente significativo no significa necesariamente que existe un problema de seguridad en la vacuna probada. Del mismo modo, un ensayo sin diferencias significativas, no indica necesariamente la ausencia de problemas de seguridad. Es fundamental fijar previo al inicio de los ensayos los criterios de aceptación o rechazo.

## 6.c) ESTUDIOS DE SEGURIDAD REPRODUCTIVA

Se debe considerar la realización de exámenes de desempeño reproductivo en animales en etapa reproductiva cuando los datos sugieran que los materiales de origen de la vacuna, tanto antígenos como excipientes, pueden constituir un factor de riesgo. Se requieren los estudios de laboratorio acompañados de los estudios de seguridad de campo, para avalar el uso en animales de reproducción. Si no se llevan a cabo estudios de seguridad reproductiva, se debe incluir una declaración de exclusión en la etiqueta, a menos que se justifique científicamente la ausencia de riesgo para el uso de la LPR en animales en etapa reproductiva.

Para el examen de seguridad reproductiva, los animales apropiados para el propósito del estudio serán vacunados al menos con la dosis recomendada de acuerdo con el esquema de vacunación indicado. Los estudios deben realizarse para cada una de las vías recomendadas. Si una vía de administración ha demostrado causar los efectos más serios, se puede seleccionar sólo esa vía para el estudio. En general y a menos que se justifique otra alternativa, se deben usar 8 animales por grupo. Los animales deben ser observados durante un período razonable para determinar la seguridad reproductiva, incluso se deben realizar observaciones de seguridad diarias. Las excepciones deben estar justificadas. Se debe incluir un grupo control negativo.

Las vacunas recomendadas para uso en animales en etapa de gestación deben ser analizadas como se describe arriba en cada una de las etapas específicas de gestación indicadas por el elaborador. Se solicitará una declaración de exclusión para los períodos de gestación no testeados. El período de observación debe extenderse hasta la parición y hasta un período razonable para estudiar la seguridad en el neonato. Las excepciones deben estar justificadas.

Cuando esté científicamente avalado, se pueden solicitar estudios complementarios para determinar el/los efecto(s) de la LPR en el semen. El

período de observación debe ser apropiado para el propósito del estudio.

#### 6.d) ESTUDIOS DE SEGURIDAD A CAMPO

Los resultados obtenidos en los estudios de laboratorio deben complementarse y corroborarse con datos procedentes de estudios realizados en condiciones productivas o de campo, realizados en un número estadísticamente representativo de animales.

Los estudios de campo están diseñados para demostrar la seguridad en las condiciones normales de uso de las vacunas y para detectar reacciones inesperadas, que pueden no haberse observado en los estudios de laboratorio

Los animales en estudio. Se debe considerar la determinación de reacciones locales, sistémicas y el efecto de la vacunación sobre los parámetros productivos.

Cuando la epidemiología de la enfermedad a prevenir y el sistema de producción sean similares en distintas regiones o países, se pueden usar los datos internacionales de estudios a campo, siempre y cuando sea aceptable por las autoridades regulatorias. El elaborador es responsable de garantizar que los estudios a campo se realicen en sistemas de producción representativos de las regiones o países para las que se busca la aprobación. Se debe obtener autorización correspondiente de las autoridades sanitarias antes de iniciar el estudio. Se recomienda consultar a las autoridades regulatorias acerca del diseño del estudio antes de comenzar.

Si la vacuna está indicada para animales en etapa reproductiva, se deben realizar estudios de seguridad a campo adecuados para demostrar la seguridad de la LPR en condiciones de campo.

En los estudios de campo, si correspondiera, la selección del protocolo a emplear para el modelo estadístico y los factores a incluirse en el modelo dependerán de la naturaleza de la variable de respuesta que se analiza y del diseño del estudio

- **Animales y Lugares de ensayo**

Los bovinos deben representar todas las edades, categorías y prácticas productivas para los que está indicada la vacuna. El estado inmunitario previo (animales sero-negativos) puede ser considerado, si bien no es una condición excluyente. Se debe incluir un grupo control negativo. Todos los animales incorporados al ensayo deben estar clínicamente sanos.

Se recomienda efectuar los estudios de seguridad en dos o más regiones geográficas distintas. Se debe(n) utilizar la(s) dosis y vía(s) de vacunación recomendadas. Los estudios deben realizarse con 3 lotes representativos de la escala industrial de la vacuna. Por lo menos 1 de los lotes deberá estar formulado con la concentración antigénica máxima declarada o, en caso de que no esté especificada se puede emplear un múltiplo de la concentración antigénica mínima

## 7. INFORME FINAL

Los procedimientos deben quedar registrados en protocolos de trabajo siguiendo las normas de buenas prácticas clínicas (BPC). Las observaciones deben realizarse durante un período de tiempo apropiado para la LPR y los eventos adversos deben documentarse e incluirse en el informe final. Se deberá intentar en la medida de lo posible determinar la causalidad del evento adverso.

El informe debe presentarse como trabajo científico, incluyendo al menos: título, código asignado, introducción, fecha de inicio y término, nombre y firma de las personas involucradas, resumen, materiales y métodos, resultados, discusión y conclusiones.

## 8. REFERENCIAS

- CAMEVET . Documento GLO 001: Glosario de Términos.
- Code of Federal Regulations (CFR) 9 . Animal and Animal Products. 113.38. Guinea Pig Safety Test. Sept. 2013
- Code of Federal Regulations (CFR) 9 . Animal and Animal Products. 113.33. Mouse Safety Tests. Sept. 2013
- European Pharmacopoeia 7.0 (2013). 5.2.6. Evaluation of safety of Veterinary Vaccines and Immunoserum.
- M.A.P.A. Brasil. Normativa 50, 23/9/2008. Regulamento técnico para produção, controle da qualidade, comercialização e emprego de vacinas contra la febre aftosa.
- OIE. Manual de pruebas de Diagnóstico y Vacunas para los Animales Terrestres, 2012. Cap. 2.4.13 .
- OIE. Manual de pruebas de Diagnóstico y Vacunas para los Animales Terrestres, 2009. Cap. 1.1.8. Safety Tests.
- SENASA, Argentina. Resol. 351 /2006. Actualización de la reglamentación que permite el control de las vacunas destinadas a la prevención de la Fiebre Aftosa.
- VICH. GL 44: Target animal safety for live and inactivated vaccines. Jul. 2008
- VICH. GL 50: Harmonization of criteria to waive Target Animal Safety Testing on Inactivated Vaccines for veterinary use. Feb. 2013

## 9. AUTORES Y PARTICIPANTES

Coordinación del Grupo de Trabajo de CAMEVET para la guía de Seguridad en Bovinos con Vacunas Inactivadas: Vena, María Marta. Fundación PROSAIA. Argentina.



- Alpizar Montero, Benigno. Punto focal de medicamentos de la OIE. Costa Rica.
- Argento, Enrique. Cámara Argentina de la Industria de Productos Veterinarios (CAPROVE). Argentina
- Chelle, Berta. Punto focal de medicamentos veterinarios de la OIE de Uruguay
- Gleser, Hugo. Cámara de Laboratorios Argentinos Medicinales Veterinarios (CLAMEVET) . Argentina
- Ham, Alejandro. CAPROVE. Argentina
- Ióppolo, Marianna. CAPROVE. Argentina
- Mórtola, Eduardo. Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. Argentina
- Ostermann, Juan Walter. CAPROVE. Argentina
- Parada Acuña, Karim. Punto focal de medicamentos veterinarios de la OIE de Chile.
- Pardo, Javier. Fundación PROSAIA. Argentina-
- Parreño, Viviana. Instituto de Virología. CICVyA – INTA. Argentina
- Smitsaart, Eliana. CAPROVE .Argentina
- Sosa, Vanessa. Asociación de la Industria de Productos Agroquímicos y Veterinarios (ADIPRAVE), Uruguay
- Zambrano Canelo, Fernando. Unidad de Registro de Medicamentos Veterinarios. SAG, Chile

**5 de Abril de 2014**

**C A M E V E T**

**Cod: 000**

**TRÁMITE I**

**FECHA: 27 de septiembre de 2013**

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

---

**REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.**

Paseo Colón 315, 5to. Piso "D" (C1063ACD), Buenos Aires, Argentina

Tel: (54-11) 4331-3919 / 5158 - Fax: (54-11) 4331-5162

e-mail: [rr.americas@oie.int](mailto:rr.americas@oie.int) Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

## AUTORES

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

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

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

## Tabla de contenidos

1. Introducción .....	3
2. Control de Potencia en Cobayos: Objetivos y Alcance .....	4
2.1 Diseño de la prueba .....	5
2.1.1 Cobayos .....	5
2.1.2 Procedimiento .....	6
2.1.3 Interpretación .....	6
2.1.4 Criterios de validación de la prueba en cobayos.....	7
2.1.5 Cálculos .....	7
2.1.6 Criterio de aprobación de las vacunas en evaluación .....	8
3. Armonización de ensayos para la región .....	8
Referencias .....	8

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

## 1. INTRODUCCION

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## **2. CONTROL DE POTENCIA EN COBAYOS: OBJETIVOS Y ALCANCE**

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

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

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

Para la validación del modelo se siguieron las recomendaciones internacionales para validación de métodos de control de vacunas veterinarias, en particular vacunas combinadas (EMEA/P038/97, 1998; Taffs, 2001). Se evaluaron en paralelo en bovinos y cobayos vacunas experimentales y comerciales, formuladas en adyuvantes oleosos y acuosos, conteniendo la valencia RVA bovino, combinada con antígenos bacterianos y virales asociados a la diarrea neonatal (*E coli*, *Samonella*, Coronavirus bovino, entre otros). La inmunogenicidad, medida en cobayos como el título de anticuerpos IgG anti RVA a los 30 días post vacunación fue correlacionada con el título de anticuerpos IgG1 anti-RVA en bovinos a los 60 días post vacunación –en coincidencia con el momento del parto. El isotipo IgG1 es selectivamente transferido del suero de la hembra al calostro durante la calostrogenesis y determina el grado de protección en los terneros neonatos (Parreño et al., 2004). Las técnicas de ELISA utilizadas fueron validadas bajo normas ISO 17025 y su procedimiento para sueros de cobayos se detalla en el ANEXO I.

El análisis realizado demostró altos índices de concordancia entre el modelo y la especie de destino. Los detalles técnicos y estadísticos de la validación se presentan en el ANEXO II de esta guía. Esta prueba puede utilizarse para el control de calidad de cada serie de vacuna de de RVA bovino a liberar al mercado. Resulta una herramienta práctica tanto para las empresas productoras de vacunas como para el organismo de control oficial, garantizando así la presencia en el mercado de productos estandarizados y eficaces.

El modelo cobayo desarrollado, es un ensayo *in vivo*, con un número limitado pero suficiente de animales (n=6 por vacuna y 4 testigos/placebos) que facilita y agiliza la evaluación de la potencia para RVA de las vacunas inactivadas y combinadas que se utilizan para prevenir las diarreas neonatales del ternero.

## **2.1 Diseño de la prueba**

### **2.1.1 Cobayos**

Se utilizan como mínimo 6 animales por cada vacuna, mayores a 30 días de edad y el peso debe ser de 400 gramos  $\pm$  50 gramos. Pueden utilizarse machos o hembras pero cada grupo debe contener animales del mismo sexo, con un plazo de adaptación después del ingreso a la sala de inoculación de SIETE (7) días como mínimo. Es importante destacar que los cobayos son naturalmente negativos a Ac contra RVA bovino.

### 2.1.2 Procedimiento

Los cobayos se inmunizan con dos dosis de vacuna (en un intervalo de 21 días), por vía subcutánea, con un volumen correspondiente a 1/5 de la dosis bovina. Los animales se mantienen bajo control durante un mínimo de 30 días y se toman muestras de suero al momento de la primera dosis de vacuna (0 días post-vacunación) y 9 días post-revacunación (30 DPV). Conjuntamente con la evaluación de la/s vacuna/s incógnitas (n=6), se incluyen dos grupos de cobayos, uno vacunado con *una vacuna de referencia* de potencia conocida (n=6) y un grupo de animales testigos no vacunados (n=4). A los treinta (30) días de iniciado el control, se sangran los animales vacunados, realizándoles el control serológico por la técnica de ELISA para la detección de Ac contra RVA bovino (ANEXO I), en forma complementaria los sueros pueden analizarse por neutralización viral, técnica que permite determinar el título de Ac neutralizantes para cada uno de los serotipo de RVA incluido en las vacunas.

### 2.1.3 Interpretación

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

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

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

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

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



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

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

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

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

Puntos de corte determinados como el log<sub>10</sub> del título de anticuerpos anti RVA (IgG en cobayos) determinado por ELISA. En bovinos se analiza el incremento de Ac post vacunación respecto del título de Ac basal también determinados por ELISA, presentes en el suero de animales vacunados con la vacuna incógnita. (y) Título promedio de Ac de grupos de 5 cobayos, evaluado a los 30 días post vacunación (dpv); (Y) grupos de 5 bovinos evaluados a los 60 dpv. Los bovinos reciben dos dosis de vacuna con un intervalo de 30 días y se muestrean a los 0 y 60 dpv. Los cobayos reciben dos dosis de vacuna (1/5 del volumen de la dosis bovina) con un intervalo de 21 días y se muestrean a los 0 y 30 dpv.

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

#### 2.1.4 Criterio de validación de la prueba en cobayos

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

#### 2.1.5 Cálculos

Se evaluarán todos los sueros de los seis animales inmunizados con la vacuna en control. Se seleccionan los CINCO (5) sueros con mayor título obtenido (expresado en log<sub>10</sub> de la

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

### **2.1.6 Criterio de aprobación de las vacunas en evaluación**

Para la APROBACIÓN de la vacuna sometida a control, el promedio del log<sub>10</sub> de los títulos de Ac IgG anti RVA a los 30 dpv en el suero de los cobayos vacunados deberá ser mayor o igual a 4.0

## **3. ARMONIZACIÓN DE ENSAYOS PARA LA REGIÓN**

Se recomienda la elaboración de un panel de sueros controles positivos y negativos, así como vacunas de referencia. Estos reactivos de referencia locales deberán estar a disposición de los usuarios de la región y se utilizarán para armonizar los resultados obtenidos por cada laboratorio de ensayos que adopte este método de control.

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

### **REFERENCIAS**

- Badaracco, A., Garaicoechea, L., Rodriguez, D., Uriarte, E.L., Odeon, A., Bilbao, G., Galarza, R., Abdala, A., Fernandez, F., Parreno, V., 2011, Bovine rotavirus strains circulating in beef and dairy herds in Argentina from 2004 to 2010. *Veterinary microbiology* 158, 394-399.
- Badaracco, A., Garaicoechea, L., Rodriguez, D., Uriarte, E.L., Odeon, A., Bilbao, G., Galarza, R., Abdala, A., Fernandez, F., Parreno, V., 2012, Bovine rotavirus strains circulating in beef and dairy herds in Argentina from 2004 to 2010. *Veterinary microbiology* 158, 394-399.
- Blanchard, P.C., 2012, Diagnostics of dairy and beef cattle diarrhea. *The Veterinary clinics of North America* 28, 443-464.
- Cho, Y.I., Han, J.I., Wang, C., Cooper, V., Schwartz, K., Engelken, T., Yoon, K.J., 2013, Case-control study of microbiological etiology associated with calf diarrhea. *Veterinary microbiology*.
- de Verdier Klingenberg, K., Vagsholm, I., Alenius, S., 1999, Incidence of diarrhea among calves after strict closure and eradication of bovine viral diarrhea virus infection in a dairy herd. *J Am Vet Med Assoc* 214, 1824-1828.
- Dhama, K., Chauhan, R.S., Mahendran, M., Malik, S.V., 2009, Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals. *Veterinary research communications* 33, 1-23.
- EMA/P038/97 1998. Position Paper on Batch Potency Testing Of Immunological Veterinary Medical Products, CVMP/IWP, V.M.E.U., ed. (The European Agency for the Evaluation of Medical Products ).
- Fukai, K., Onoda, H., Itou, T., Sato, M., Miura, Y., Sakai, T., 2004, Genetic and serological characterization of novel serotype G8 bovine group A rotavirus strains isolated in Japan. *J Vet Med Sci* 66, 1413-1416.

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

## ANEXO VII

### BALANCE CAMEVET 2015-2016

- Los recursos del CAMEVET se originan en el pago de inscripciones a los Seminarios.
- El presente Balance responde al período del 31 de diciembre de 2014 al 31 de octubre de 2015.
- Se presentan los ingresos y gastos tanto en dólares USA como en Pesos argentinos

#### Cuenta en dólares hasta Octubre 31, 2015

<b>Ingresos</b>	<b>31/12/2014 - 31/10/2015</b>
Recursos disponibles al 31 de diciembre 2014	USD 66,468.00
<b>Subtotal de Ingresos</b>	<b>USD 66,468.00</b>
<b>Nota: Total correspondiente al cierre de año 2014 que incluye, las inscripciones del Seminario en Canadá 2014 USD 26700 y lo acumulado de años anteriores.</b>	
<b>Egresos</b>	
<b>Gastos fijos (Salarios )</b>	
Secretario CAMEVET (Dr. Enrique Argento)	USD 4,000.00
Secretaria Asistente ( Srta. Ana Maria Sgammini)	USD 3,000.00
Gastos Admin. Por uso de las Oficinas de la OIE (150/mes)	USD 1,500.00
<b>Subtotal Gastos Fijos</b>	<b>USD 8,500.00</b>
<b>Gastos para la Reunión Anual de CAMEVET</b>	
Financiación a Puntos Focales para Reunión Anual de CAMEVET (Cuba , costo de tkt)	USD 818.00
Financiación para Oradores Reunión Anual de CAMEVET	0
Gastos Staff CAMEVET (Viáticos y gastos misceláneos)	0
Compras de Materiales para la Reunión Anual de CAMEVET	0
<b>Subtotal</b>	<b>USD 818.00</b>
<b>Gastos de Participación en Otros Eventos</b>	
Participación en reuniones del VICH Outreach Meetings	USD 2,589.00
OIE Conference Regional Commission for the Americas	
<b>Subtotal</b>	<b>USD 2,589.00</b>
<b>Otros Gastos</b>	
Internet ( Dominio de CAMEVET)	USD 10.00
<b>Subtotal</b>	<b>USD 10.00</b>
<b>Gastos Variables</b>	
Cambio de Dólares a Pesos Argentinos	USD 4,000.00

<b>Subtotal</b>	USD 4,000.00
<hr/>	
<b>Subtotal de Gastos</b>	USD 15,917.00
<hr/>	
<b>Total de Ingresos menos Egresos hasta Octubre 2015</b>	<b>USD 50,551.00</b>

**Nota: Viáticos -PF Cuba serán entregados durante el Seminario USD 953.00**

**Cuenta en Pesos hasta Octubre 31, 2015**

<b>Ingresos</b>	<b>31/12/2014 - 31/10/2015</b>
Recursos disponibles al 31 de diciembre de año 2014	ARS 12,405.00
Inscripción al Seminario CAMEVET 2015	ARS 60,000.00
Devolución de Gastos	ARS 0.00
Cambio de Dólares a Pesos Argentinos*	ARS 57,800.00
<b>Subtotal</b>	<b>ARS 130,205.00</b>

**\*Corresponde a 4000 dólares USA cambiado a ARS para compra de pasajes aéreos de Seminario y reuniones VICH**

**Nota: Del saldo de Inscripción en pesos ARS 60,000 el día 5 de noviembre se descontaron ARS 4,000 por pago duplicado de una inscripción correspondiente al Laboratorio OVER de Argentina. Total de inscripciones recibidas hasta el 6 de Noviembre ARS 56,000 pesos**

**Egresos**

**Gastos para la Reunión Anual de CAMEVET**

Gastos por compra de tiquetes aéreos (Dr. Argento – Sta. Ana Sgaminni)	ARS 28,167.00
<b>Subtotal</b>	<b>ARS 28,167.00</b>

**Gastos de Participación en Otros Eventos**

Gastos por compra de tiquetes aéreos -Dr. Argento – Vich*	ARS 44,043.70
<b>Subtotal</b>	<b>ARS 44,043.70</b>

**\*Nota:** Reuniones de Vich Outreach Forum

1. 24-25 de febrero, Washington DC USA
2. 25 - 29 de octubre, Tokio Japón

**Otros Gastos**

Varios (Clases de Inglés Secretaria)	ARS 3,900.00
Misceláneos ( Placa de Reconocimiento)	ARS 1,288.00
<b>Subtotal</b>	<b>ARS 5,188.00</b>

<b>Subtotal de Gastos</b>	ARS 77,398.70
<b>Total de Ingresos menos Egresos hasta Octubre 2015</b>	<b>ARS 52,806.30</b>

### Informe de ingresos y gastos CAMEVET Hasta 31 de Octubre 2015

<b>Dólares disponibles al 31 de octubre del corriente año</b>	50,551.00 USD
<b>Pesos disponibles al 31 de octubre del corriente año</b>	52,806.30 ARG*
(*Incluye inscripciones al XXI Seminario en pesos Argentinos)	

#### Ingresos

##### Inscripción al XXI Seminario Guatemala 2015

Inscripción en Pesos 14 participantes	56,000.00 ARG*
Inscripción en Dólares 115 Participantes*	40,975.00 USD

\* Se aplicaron diferentes categorías de inscripción y descuentos a patrocinadores.

**Nota:** Las inscripciones en pesos en total hasta 31 de Octubre fueron ARS 60,000.00 pero el 5 de Noviembre se hizo una devolución de ARS 4,000.00 pesos. A Organización Veterinaria Regional SRL por doble pago de la inscripción de Sr. Diego Eborraz.

**Nota:\*** De las inscripciones en dólares se emitió el pago de financiación Dr. Lemes Anaya por el concepto de full per diem por 6 días -USD 953.

#### Previsión de gastos 2015 – 2016

<b>Existencias al 31 de octubre de 2015</b>	<b>ARS 52,806.30</b>	<b>USD 50,551.00</b>
<b>Ingresos</b>		<b>USD 40,022.00</b>
<b>Totales al 13 de noviembre</b>	<b>ARS 52,806.30</b>	<b>USD 90,573.00</b>

<b>Salario secretario CAMEVET (Dr. Enrique Argento)</b>	<b>USD 4,000.00</b>
<b>Salario secretaria Asistente (Srta. Ana Maria Sgammini)</b>	<b>USD 3,000.00</b>
<b>Gastos Admin. Por uso de las Oficinas de la OIE (150/mes)</b>	<b>USD 1,500.00</b>
<b>Participación en reunión de VICH, Bruselas, junio de 2016 (Ticket aéreo y viáticos)</b>	<b>USD 3,500.00</b>
<b>Internet (renovación anual dominio @camevet.org)</b>	<b>USD 10.00</b>
<b>Total presupuesto de gastos</b>	<b>USD 12,010.00</b>

## Inscripciones Argentina 2015

No.	Nombre	Organización	País	Pago
1	Carlos Rufrano	CLAMEVET	ARGENTINA	ARS 4,000.00
2	Bruno Forti	CLAMEVET	ARGENTINA	ARS 4,000.00
3	Jorge Armando Dale	CLAMEVET	ARGENTINA	ARS 4,000.00
4	Patricia Garcia D'Auro	CDV	ARGENTINA	ARS 4,000.00
5	Martin Costi	Laboratorio WEIZUR	ARGENTINA	ARS 4,000.00
6	Gustavo Belligni	VITAFORMA	ARGENTINA	ARS 4,000.00
7	Carlos Francia	CAPROVE	ARGENTINA	ARS 4,000.00
8	Eduardo Lopez	CAPROVE	ARGENTINA	ARS 4,000.00
9	Juan Carlos Sosa	CHINFIELD S.A.	ARGENTINA	ARS 4,000.00
10	Mrs. Milena Aguirre	OVER	ARGENTINA	ARS 4,000.00
11	Diego Esbarraz	OVER	ARGENTINA	ARS 4,000.00
12	Niels Scherling	BROUWER S.A.	ARGENTINA	ARS 4,000.00
13	Rodolfo Perotti	BROUWER S.A.	ARGENTINA	ARS 4,000.00
14	Federico Luchter	CAPROVE	ARGENTINA	ARS 4,000.00
<b>Pago de inscripción en pesos</b>				<b>ARS 56,000.00</b>

## Inscripciones en dólares americanos 2015

Nº	Participante y/o Organismo	Pago USD	Recibo Nº
1	Agribands Purina Perú S.A	350	0025
2	Ilender Peru S.A	350	0026
3	Virbac México S.A	350	0027
4	Lauda S.A.P	350	0028
5	Phibro Animal Health	350	0029
6	Alba Codutti	350	0030
7	Regulatory Affairs Global	350	0031
8	Raquel Pinto López	350	0032
9	Leonardo Costa	350	0033
10	Phibro Animal Health	450	0034
11	Real & CIA Ltda	450	0035
12	Vecol S.A	450	0036
13	Heel Colombia Ltda	350	0037
14	Francisca Galvez	350	0038
15	Chemie S.A	350	0039
16	Prondil S.A	350	0040
17	Prondil S.A	350	0041
18	Laboratorios Norvet	350	0042
19	Zoetis Mexico S.A de C.V	350	0043
20	Zoetis Costa Rica C.R.L	350	0044
21	Rebexa Group	700 (2 inscripciones por 350)	0045

22	Biokhemia	350	0046
23	Distrivet S.A	350	0047
24	Compañía Libeles S.A	350	0049
25	Laboratorios Pasteur S.A	350	0050
26	Saint CyR S.R.L	350	0051
27	Biozoo S.A de C.V	225 (Patrocinador plata 50% descuento)	0052
28	Químicas Veterinarias S.A	900 (2 inscripciones por 450)	0053
29	Adriana Karkaukas	350	0054
30	Laboratorio Labyes	350	0055
31	Ceva	350	0056
32	Ceva	350	0057
33	Ceva	350	0058
34	Alcames Laboratorios	350	0059
35	Proagro S.A	1050 (3 inscripciones por 350)	0060
36	Vetanova	350	0061
37	Desarrollo y Nutricion Animal S.A	350	0062
38	Alexandra Luna Orta	350	0063
39	Itamis Garcia	350	0064
40	Karina Rosales Bosch	350	0065
41	Diasmarys Salinas	350	0066
42	Tecnocalidad S.A	450	0067
43	Coaspharma S.A.S	450	0068
44	Farbiovet	350	0069
45	Global Vet	225 (Patrocinador plata 50% descuento)	0070
46	Pet Kraft	225 (Patrocinador plata 50% descuento)	0071
47	Agrozona Guatemala S.A	450	0072
48	Flavia Schubert	350	0073
49	Virback	350	0075
50	Cargill Alimentos	350	0076
51	Cargill Alimentos	350	0077
52	Biogenesis Bago S.A	350	0078
53	Biogenesis Bago S.A	350	0079
54	Calox	350	0080
55	Mariana Nunes la Paz	350	0081
56	Luara Garcia	350	0082
57	Phibro Animal Health	350	0083
58	Biomeda	350	0084
59	Aracelly Espinosa	175 (Patrocinador plata 50% descuento)	0085
60	Agrovet Market	350	0086
61	Agrovet Market	350	0087



62	Cámara de insumos Agropecuarios	350	0088
63	Cev	350	0089
64	Lapisa	450	0090
65	Laura Lorenzetti	350	0091
66	Corex S.A de C.V	350	0093
67	Corex S.A de C.V	350	0094
68	Heloiza Pereira	350	0095
69	Arleni Concha Paula	350	0096
70	Silvia Melgar	350	0097
71	Hallmark S.A	350	0098
72	Luisa Vargas	350	0099
73	Flavia Fernández	350	0100
74	Faryvet	350	0101
75	Vedilab	700 (2 inscripciones por 350)	0102
76	Liliana Revolledo	350	0103
77	Ricardo Pinto	350	0105
78	Valeria Capurro	450	0106
79	Intervet Colombia	350	0107
80	Vicar Farmaceutica	450	0108
81	Bayer S.A	350	0109
82	Bayer S.A	350	0110
83	Bayer S.A	350	0111
84	Mundo Animal	350	0112
85	Laboratorios Hipra S.A	350	0113
86	Ourofino Saude Animal	1050 (3 inscripciones por 350)	0114
87	Carval	350	0115
88	Mustad Argentina S.A	350	0116
89	Laboratorios Biomont S.A	175 (patrocinador plata 50% descuento)	0118
90	Clea Camargo	450	0119
91	Labipharma S.A	175 (patrocinador plata 50% descuento)	0120
92	Alanac	175 (patrocinador plata 50% descuento)	0121
93	Liliana Torres	350	0122
94	Intervet México S.A de C.V	350	0124
95	Investigación Aplicadas S.A de C.V	450	0125
96	Bioboi Homeopatia Animal	450	0126
97	Labovet Productos Veterinarios Ltda	1350 (3 inscripciones por 450)	0127
98	Laboratorios Tornel	350	0129
99	Labiana Life Sciences	350	0130
100	Marcelo Allignani	350	0131
101	Laboratorios Biomont S.A	450	0133
102	Laboratorios Biomont S.A	350	0134

103	Asociacion Nacionales de Laboratorios Veterinarios A.C	350	0135
104	Globalvet S.A.C	350	0136
105	Globalvet S.A.C	350	0137
106	Boehringer Ingelheim Perú S.A.C	350	0138
	<b>TOTAL</b>	<b>40.975,00</b>	