

## DESARROLLO Y VALIDACIÓN ESTADÍSTICA DEL MODELO COBAYO INTA PARA EL CONTROL DE POTENCIA DE VACUNAS CONTRA CORONAVIRUS BOVINO

Investigador USAL: Fernández, Fernando (fernando.fernandez1@usal.edu.ar).

Investigadores Externos: Parreño, Viviana; Bok, Marina.

**Palabras clave:** Coronavirus; Diarrea; Ternero; Vacuna.

### Resumen

Las vacunas destinadas a prevenir el síndrome de diarrea neonatal del ternero que incluyen coronavirus bovino (CoV) carecen hasta el momento de un método validado para evaluar su calidad inmunogénica. Resulta crítico desarrollar y validar un modelo experimental para ser utilizado en el control de la potencia de dicha vacuna.

Aquí se describen los resultados preliminares de un estudio de dosis-respuesta de vacunas de CoV en cobayos. Grupos de cinco cobayos recibieron a los 0 y 21 días dos dosis de vacunas formuladas con concentraciones crecientes de CoV ( $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  DICT50/dosis y placebo) en adyuvante oleoso y acuoso. Se administraron dos lotes de cuatro vacunas cada uno a dos grupos de cinco cobayos, lo que resultó en un total de 160 animales vacunados. El volumen de dosis en cobayos fue 1/5 de la dosis bovina. A los 30 días posvacunación, se determinó el título de anticuerpos (Ac) anti CoV por ELISA. La menor concentración viral ( $10^5$  DICT50/dosis) en adyuvante acuoso no indujo Ac, y la oleosa indujo respuestas erráticas. Las vacunas con  $10^6$  de CoV DICT50/dosis indujeron títulos promedio de 4 o mayor. Las vacunas formuladas con  $10^7$  DICT50/dosis indujeron títulos promedios mayores a 4,7. El modelo cobayo fue capaz de discriminar entre vacunas formuladas con dosis crecientes de antígeno, independientemente del adyuvante utilizado. Para vacunas con  $10^6$  de CoV DICT50/dosis, las formulaciones con adyuvante oleoso indujeron títulos de Ac significativamente mayores que sus contrapartes acuosas (modelo lineal general mixto, VarIdent  $p < 0.05$ ).

Al realizar un análisis de regresión lineal con componente cuadrático sobre los títulos de Ac anti CoV promedio, obtenido para cada concentración de antígeno, se pudieron establecer cortes de calidad, clasificando como de potencia satisfactoria las vacunas que induzcan títulos mayores a 3.05, y muy satisfactorias a las vacunas que induzcan títulos mayores a 4.01. Trabajos posteriores con un número significativo de series de vacunas permitirían completar la validación del modelo aquí descrito, y su posterior transferencia al SENASA y a la industria veterinaria. Un objetivo adicional será la elaboración de una guía de recomendaciones para elevar al Comité Americano de Medicamentos Veterinarios (CAMEVET) y promover su adopción, no solo en Argentina sino también en otros países de América.

**Keywords:** Coronavirus; Diarrhea; Guinea Pig model; Vaccine.

### **Abstract**

The veterinary vaccines used to prevent the neonatal calf diarrhea syndrome that include bovine coronavirus (BCoV) do not have so far a validated method for evaluating its immunogenicity. In this regard, it is crucial to develop and validate (in statistical terms) a lab animal model and the associated serological techniques to establish the potency of these vaccines.

The preliminary results of a CoV vaccine dose-response study in guinea pigs are described herein. Briefly, groups of 5 guinea pigs each received two doses of vaccines formulated with increasing concentrations of BCoV ( $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/dose and placebo) at days 0 and 21 in both oil and aqueous adjuvants, in order to represent the formulations available in the market. Two 5-guinea pig groups were administered two batches of four vaccines each, resulting in a total of 160 vaccinated animals. The guinea pig dose corresponded to 1/5 of the volume of the bovine dose. At day 30 post-vaccination, the serum antibody (Ab) titer to BCoV was evaluated by ELISA. The lowest concentration of BCoV used ( $10^5$  TCID<sub>50</sub>/dose) in aqueous adjuvant did not induce a detectable Ab response, while the oil counterpart induced erratic results. Vaccines containing CoV  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/dose induced a mean Ab titer equal to or higher than 4 and vaccines formulated with the highest dose ( $10^7$  TCID<sub>50</sub>/dose) induced mean Ab titers higher than 4.7. The guinea pig model was able to significantly discriminate among vaccines formulated with 1-log difference in their antigen concentration, independently of the adjuvant used. Oil vaccines containing CoV  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/dose induced significantly higher mean Ab titers than their aqueous counterparts (general linear mixed model, VarIdent,  $p < 0.05$ ).

After linear regression analysis, two split points of vaccine quality were established. Vaccines inducing Ab titers lower than 3.0 were considered of low potency, vaccines inducing Ab titers between 3.0 and 4.0 were considered of good quality while vaccines inducing Ab titers higher than 4.0 were classified as of very good quality. The evaluation of these vaccines in bovine is in progress in order to determine the association between the Ab titers obtained in guinea pigs and the target species. Finally, a concordance analysis with commercial vaccines tested in the lab animal model vs. bovines will allow the final validation of the model for its further transference to the Argentinean animal health authority (SENASA) and the local vaccines companies. An additional aim will be the drafting of guidelines to be presented to the OIE local office (CAMEVET) in order to promote the adoption of this quality control, not only in Argentina but also in other countries of the Americas.