

ANEXO I

A- ELISA para BoHV

Este ensayo es un ELISA directo para la detección de anticuerpos anti-BoHV-1. Kit del INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGIA AGROPECUARIA (INTA).

Se sensibilizan placas con virus BoHV-1 (obtenido a partir de células MDBK infectadas) (pocillo positivo) o células MDBK control negativo de infección (pocillo negativo), especialmente preparado para tal fin. La concentración óptima de virus y mock para sensibilizar las placas se determina por titulación cruzada para cada lote producido y es constante para toda la placa. Los sueros se ensayan en ambos posillos (+ y -) en diluciones seriadas base 4 comenzando desde una dilución mínima de 1/40 en SEIS (6) diluciones para evaluar la respuesta a la vacunación de cobayos (Parreño, Romera y col, 2010).

El ensayo se revela utilizando como anticuerpo detector un Ac anti IgG (H+L) de cobayo marcado con peroxidasa. Como sistema sustrato cromógeno se utiliza H2O2/ABTS.

MATERIALES

- Placas para ELISA Immulon 1 B (Dynatech Lab, USA, cat. # 014-01-3455).
- Tips amarillos (hasta 200 µl).
- Tips azules (hasta 1000 µl).
- Tips blancos Multistep Multicanal (1000 µl).
- Cubetas descartables o reciclables autoclavables.
- Descarte.
- Bolsas de autoclave verdes.
- Papel absorbente.
- Guantes descartables.

EQUIPOS

- Micropipeta hasta 200 µl (tolerancia máxima admitida: 5 µl).
- Micropipeta hasta 20 µl (tolerancia máxima admitida: 0.2 µl).
- Micropipeta hasta 1000 µl (tolerancia máxima admitida: 10 µl).
- Micropipeta multicanal OCHO (8) o DOCE (12) canales, hasta 300 µl. Sin restricciones respecto a la tolerancia.
- Estufa de 37°C con atmósfera controlada a CERO COMO CINCO POR CIENTO (0,5%) de CO₂. Se admite para esta técnica una variabilidad en el rango de:

(Preparar en el momento de uso sólo la cantidad necesaria y descartar el remanente).

Solución madre ABTS 300 µL

Buffer Acido cítrico 10 ml

Agua oxigenada (H₂O₂) 10 µL

Se puede reemplazar por soluciones de ABTS comerciales listas para usar

- SDS (dodecil/laurel sulfato de sodio) al CINCO POR CIENTO (5%) en agua.
- Agua Oxigenada de 30 volúmenes.
- Buffer de Lavado (PBS 1X Tween 0,05%)

PBS 1000 ml

Tween20 500 µL

- Buffer de bloqueo y diluyente. PBS/Tween 20 0.05%/OVA 1% PH 7.4

Tween20 500 ul.

PBS 1X 1000 ml.

Ovoalbúmina 10 grs.

ANTIGENO

Antígeno viral positivo: Preparado a partir de cultivos de MDBK infectados con cepas de BHV-1 de referencia.

Antígeno control, negativo o mock: Preparado a partir de cultivos de MDBK mock infectados.

CONJUGADO

Conjugado Anti IgG de Cobayo marcado con peroxidasa.

Affinity purified goat anti- Guinea Pig Ig G (H+L) peroxidase labeled, KPL, cat. # 14-17-06.

Peroxidase- conjugated affiniPure Goat anti-guinea pig IgG (H+L), Jackson, cat. # 106-035-003

Conjugados de otras marcas o conjugados producidos internamente previamente verificados/validados en INTA como óptimos para ser utilizados en el ensayo de ELISA.

CONTROLES

Se utiliza un Control Positivo (suero de cobayo inmunizado con vacuna de referencia, de título conocido), un Control Negativo, (suero negativo para cualquier concentración de siembra) y Blanco de Reactivos (PBS). Para cada uno de los controles se utilizan CUATRO (4) pocillos (DOS (2) capturas positivas y sus DOS (2) capturas negativas correspondientes).

Se recomienda además, incluir en cada ensayo una muestra positiva de título conocido y otra muestra negativa (sueros estándares internos). Estas muestras se siembran aleatoriamente en distintos lugares en al menos dos de las placas del ensayo y se corren en todos los ensayos.

Control positivo cobayo: Pool de sueros de CINCO (5) cobayos vacunados con DOS (2) dosis de 0.600 ml de vacuna conteniendo 107 DICT50/ml de HoVB-1 en adyuvante oleoso o acuoso según corresponda (Vacuna de Referencia INTA-SENASA).

Se considerarán conformes aquellos ensayos donde el control positivo se encuentre dentro del valor promedio ± 1 desvío Standard (SD).

valor promedio ± 1 SD = 0.520 \leq 0.740 \leq 0.960

Dicho suero, analizado por seroneutralización debe arrojar un título de anticuerpos neutralizantes contra BoHV-1 entre DOS PUNTO CUATRO (2.4) y TRES PUNTO CERO (3.0).

Control negativo cobayo: Suero de cobayo cuya absorbancia corregida en la dilución de uso resulte menor al cut off de la técnica CUARENTA POR CIENTO (40%) de la absorbancia corregida del control positivo.

STD +: Suero positivo de cobayo de título conocido

STD

Preparación: Estos controles y estándares se seleccionan a partir de sueros de cobayos vacunados con vacunas de concentración de Ag conocida y asignada como vacuna de referencia.

PROCEDIMIENTO DEL ELISA

Sensibilización de la placa.

Realizar la dilución de trabajo del Antígeno Positivo (Producción de virus BoHV-1) en Buffer Coating pH 9,6.

Diluir el Ag Negativo (MDBK Mock) en la misma dilución que el Ag + en Buffer Coating pH 9,6.

Colocar 50 μ l de Captura Positiva en las filas B-D-F-H.

Colocar 50 μ l de Captura Negativa en las filas A-C-E-G.

Se necesitan 3 ml de Ag+ y Ag- por placa de NOVENTA Y SEIS (96) pocillos

- Incubar la placa tapada ON (17 horas \pm 2 hs), entre 4° C y 8° C.
- Descartar el contenido de la placa.

- Lavar la placa TRES (3) veces con PBS/Tween20 0,05%.
- Secar golpeando la placa contra un papel absorbente.

1. Bloqueo

Sobre la placa sensibilizada con Virus y Mock, lavada y secada según el punto 3.1, se deben colocar 100 µL/pocillo de Buffer de bloqueo (PBS/Tween20 0.05%, Ova 1%, pH 7.4).

- Incubar la placa 1 hora ± 15 minutos, a 37°C en 5% CO₂.
- Descartar el contenido de la placa.
- Secar golpeando la placa contra un papel absorbente.

2. Muestras

Descongelar las muestras a ensayar, así como también controles y estándares positivos y negativos.

En un ensayo estándar entran SIETE (7) muestras por placa, con SEIS (6) diluciones para cada una, aunque según las necesidades especiales se pueden diseñar las placas con más muestras, y menos diluciones por muestra.

Las diluciones de las muestras se realizan en placas sustitutas (placas limpias de NOVENTA Y SEIS (96) pocillos aptas para cultivos celulares).

Los pocillos donde se sembrarán los controles (Positivo, Negativo y PBS), no deben ser completados con PBS en la placa sustituta, sino que se cargarán directamente sobre la placa original (ver diseño de placa).

Para el sembrado de muestras y diluciones correspondientes se procederá sobre la placa sustituta.

Se colocarán 195 µL, de buffer diluyente en las columnas 1 (A-B-C-D-E-F-G-H) y 7 (A-B-C-D-E-F-G-H).

Se colocarán 150 µl de buffer diluyente en el resto de las columnas 2-3-4-5-6 (A-B-C-D-E-F-G-H) y 8-9-10-11-12 (C-D-E-F-G-H).

En los pocillos 1H y 1G se colocarán 5 µl respectivamente de la muestra "1".

En los pocillos 1F y 1E se colocarán 5 µl respectivamente de la muestra "2". Así sucesivamente con el resto de las muestras (ver ilustración de diseño de placa).

Placa Nº	195ul 5ul	150ul	150ul	150ul	150ul	150ul	195ul 5ul	150ul	150ul	150ul	150ul	150ul	diluyente muestra
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Mtra4						Ctrol+	Ctrol+	Ctrol-	Ctrol-	PBS	PBS	
B	Mtra4						Ctrol+	Ctrol+	Ctrol-	Ctrol-	PBS	PBS	
C	Mtra3						Mtra7						
D	Mtra3						Mtra7						
E	Mtra2						Mtra6						
F	Mtra2						Mtra6						
G	Mtra1						Mtra5						
H	Mtra1						Mtra5						

Diseño de placa:

- Diluciones de muestras:

Con una pipeta multicanal de 50 µl se homogenizarán las muestras de la primer columna de pocillos (195 µl PBS+ 5 µl muestra) y se traspasarán 50µl a la segunda columna, donde se homogenizará tomando 50 µl para traspasarlos a la siguiente. Así sucesivamente hasta la columna SEIS (6) inclusive. El mismo procedimiento se seguirá desde la columna UNA (1) a SEIS (6) y con nuevos tips de SIETE (7) a la DOCE (12) inclusive.

De esta manera quedarán las muestras diluidas, desde una dilución inicial de 1/40 y luego diluciones en base 4 (Rango de diluciones analizadas expresadas en logaritmos: 1.6-4.61).

Tomar 50 µL de las diluciones hechas en la placa sustituta, y traspasarlos a la placa de reacción, utilizando el mismo set de tips comenzando de la dilución más diluida a la más concentrada.

Sembrado de controles: Preparar la dilución correspondiente de los controles y sembrar 50 µl de éstos en los pocillos correspondientes 7-8 y 9-10, A-B de la placa de reacción según se indica en la figura.

- Luego de sembradas todas las muestras en la placa:
- Incubar la placa 1 hora ± 15 minutos, a 37°C en 5% CO₂.
- Descartar el contenido de la placa.
- Lavar la placa 4 veces con PBS/Tween 0.05%.

- Secar golpeando la placa contra un papel absorbente.

3. Conjugado.

Realizar la dilución de conjugado en PBS Tween OVA, según su título específico para este ensayo. Agregar la dilución de uso (según su titulación en este ELISA) de conjugado Anti IgG de Cobayo marcado con Peroxidasa.

- Colocar 50 µl en todos los pocillos.
- Incubar la placa UNA (1) hora a 37°C en 5% CO₂.
- Descartar el contenido de la placa.
- Lavar la placa CINCO (5) veces con PBS/Tween 0.05%.
- Secar golpeando la placa contra un papel absorbente.

4. Revelado

Preparar: Solución de uso ABTS

Sol. Madre 300 µl

Buffer ácido cítrico 10 ml

Agua oxigenada 10 µL

Se necesitan 5 ml de solución de Revelado por placa de NOVENTA Y SEIS (96) pocillos

- Colocar 50 µl, en cada pocillo
- Dejar reaccionar 10 minutos o hasta que los controles entren en el rango esperado de lectura.

Los SD+ deben llegar a su título correspondiente.

- Cortar la reacción con 50 µl de SDS al 5%

5. Lectura y cálculos

LECTURA

- Leer las placas a 405 nm o 410 nm en un Lector de ELISA.

CALCULOS

Calcular la Densidad óptica (DO) corregida de cada muestra (DO cap positiva - DO de cap negativa).

Calcular el promedio de las réplicas del control positivo.

Calcular el CUARENTA POR CIENTO (40%) del promedio del control positivo.

Calcular el promedio de las réplicas del control negativo.

Calcular el SD del control negativo.

Calcular el PP% de cada muestra en cada dilución

$PP = \frac{DO_{corr. \text{ muestra}}}{DO_{corr. C+}} * 100$

6. Aceptación del ensayo (CONFORMIDAD)

Los criterios que a continuación se describen se aplicarán individualmente a cada placa.

Los resultados pueden interpretarse e informarse siempre que se haya dado conformidad al ensayo.

El ensayo se considera conforme cuando: el valor de la DOc del control positivo se encuentra dentro del rango establecido (0.520 a 0.960), el control negativo y el blanco de reactivos presentan porcentaje de positividad menores al punto de corte de la técnica CUARENTA POR CIENTO (40%), el título del suero standard positivo da el valor esperado +/- una dilución base 4 (error del método).

Para validar el ensayo los sueros de los cobayos inmunizados con la vacuna de referencia deben dar un título promedio dentro del rango establecido como el valor promedio obtenido (luego de realizar 5 pruebas) \pm dos desvíos estándar.

7. Informe de resultados

Se informa el título de Ac anti-BoHV-1 detectado como el log en base 10 de la inversa de la máxima dilución cuyo porcentaje de positividad es mayor o igual al punto de corte del ensayo, establecido como mayor o igual al CUARENTA POR CIENTO (40%) del control positivo (100%PP).

Las muestras negativas en la mínima dilución de suero ensayada (1/40) se expresan con un título arbitrario de CERO PUNTO TRES (0.3) para los cálculos.

8. APROBACION DE LA PRUEBA DE POTENCIA EN COBAYO SEGUN ESTA TECNICA

Se evaluarán todos los sueros de los animales inmunizados con la vacuna en control. Se seleccionarán CINCO (5) de los sueros con mayor título obtenido y sobre ellos se realizará el promedio. Para la APROBACION de la vacuna sometida a control, el promedio de los títulos deberá ser mayor o igual a 1.93 por la técnica de ELISA para BoHV-1.

B- SERONEUTRALIZACION PARA BoHV-1

La prueba de seroneutralización para la detección de Ac contra BoHV-1 emplea el método Suero variable-virus fijo: donde diluciones variables de sueros problema (seriadas base 2 o base 4) se enfrentan a una cantidad establecida y fija de virus (100 DICT50/ml). La mezcla suero-virus se coloca en un sistema susceptible a la infección por BoHV-1, en este caso células de línea MDBK.

La inversa de la mayor dilución que protege a las células de la infección se denomina título

seroneutralizante del suero (expresión del título por punto final).

El título neutralizante del suero también se puede establecer por el método de Reed y Muench (virus fijo-suero variable).

MATERIALES

- Placas de Cultivo de NOVENTA Y SEIS (96) pocillos, estériles.
- Tips amarillos (hasta 200 μ l).
- Tips azules (hasta 1000 μ).
- Tubos plásticos cónicos de 1500 μ l.
- Tubos cónicos de 50ml.
- Frascos de vidrio con tapa a rosca (GIBCO o similar).
- Pipetas de vidrio estériles de 5-10ml.
- Cubetas descartables.
- Descarte.
- Bolsas de autoclave verdes.
- Papel absorbente.

EQUIPOS

- Micropipeta monocal, hasta 200 μ l (tolerancia admitida 5).
- Micropipeta monocal, hasta 20 μ l (tolerancia admitida 5).
- Micropipeta monocal, hasta 1000 μ l (tolerancia admitida 10).
- Micropipeta multicanal 8 hasta 1000 μ l. Sin restricciones respecto a la tolerancia.
- Micropipeta multicanal 12. Sin restricciones respecto a la tolerancia.
- Propipeta (pipetaid, Drummond Scietific Co. O equivalente).
- Incubadora de 37°C y 5% CO₂.
- Cabina de seguridad biológica.
- Baño termostático (temperatura a 56 \pm 3°C).
- Heladera 4-8°C.
- Microscopio óptico invertido.

REACTIVOS

- Suspensión de células MDBK: con una concentración de 250.000 cel./ml, (rango 200.000-280.000).
- MEM-E
- Suero Fetal Bovino (SFB): controlado (libre de micoplasmas y endotoxinas y probado en cultivos celulares), fraccionado en alícuotas de 10 ± 2 ml y 20 ± 2 ml y conservado a $-20 \pm 3^\circ\text{C}$.
- Antibiótico 100X

Penicilina sódica G	10,025 gr
Sulfato de Streptomina	33,35 gr
Gentamicina SO4	25 gr
PBS(10X)	50 ml
Agua destilada c.s.p.	5 litros

Una vez disuelto se esteriliza por filtración (0.22 μm) y se almacena a $-20 \pm 3^\circ\text{C}$.

La fracción en uso se conserva a $4-8^\circ\text{C}$.

Se adiciona 10 ml de ATB por cada litro de medio de trabajo.

- Virus de trabajo: BoHV-1 Cepa de referencia Los Angeles (LA) o cepa de virus BoHV-1 autóctonos. Diluida de tal manera de contener 100DICT 50%.

CONTROLES

- * Control positivo cobayo: Suero de cobayo vacunado con vacuna anti-BoHV-1.
- * Control negativo cobayo: Pool de sueros normales de cobayo (sueros de cobayos pre-inmunización).
- * Estándar positivo: Suero de título conocido.
- * Estándar negativo: Suero normal de cobayo.

Preparación: Estos controles se seleccionan a partir de sueros de cobayos vacunados con vacunas de referencia para BoHV-1.

Se corren en un mínimo de CINCO (5) ensayos de SN y se seleccionan si su título cumple con los requisitos antes mencionados. Diluir $\frac{1}{2}$ en glicerol para evitar su congelamiento, fraccionar en alícuotas de 100 μl y almacenar a -20°C .

PROCEDIMIENTO

1. Suspensión celular

Se necesitan 10ml de suspensión celular con 250.000 cel./ml por placa.

Una vez que se recibe la suspensión se realiza el recuento celular, si la suspensión contiene menor cantidad de células, ésta se concentra por centrifugación a 1000 rpm, 5 minutos y se elimina el sobrenadante excedente. Si la suspensión contiene más células se diluye con medio de trabajo. Una vez realizado el ajuste se repite el recuento, el rango admitido va desde 200.000-280.000 cel/ml. Una vez ajustada la suspensión se mantiene a temperatura ambiente bajo agitación suave en agitador magnético.

Fórmula a utilizar para el ajuste:

$$\text{vol final} = \text{conc inicial} * \text{vol inicial} / 250.000 \text{ cel/ml}$$

2. Inactivación de las muestras

Previo a su utilización en el ensayo de SN, las muestras de suero deben ser inactivadas en baño a $56 \pm 3^{\circ}\text{C}$, durante 30 ± 5 minutos. Este paso se realiza fundamentalmente para inactivar el complemento de los sueros a analizar.

3. Preparación del medio de trabajo

El medio de dilución de las muestras y del virus, se prepara a partir del MEM-E + 1% de ATB + 2% de SFB.

4. Ensayo de SERONEUTRALIZACION SUERO VARIABLE-VIRUS FIJO

- Colocar 75 μl /pocillo de medio en todas las placas a utilizar.
- Diseño de la placa de los sueros problema: Agregar 25 μl de la muestra problema, por cuadruplicado, (Fila A o Fila E pocillos 1-4; 5-8; 9-12, respectivamente) (ver figura 1).
- Se comienza desde una dilución mínima de 1/4 que sumado al volumen de virus y células queda en una dilución inicial de 1/8.
- Incluir en forma aleatoria entre las muestras a analizar estándares de título conocido.
- Diseño de la placa control: Se colocan los sueros control positivo y negativo del mismo modo que las muestras. Para realizar el control de células se colocan 150 μl de medio de trabajo por cuadruplicado en cuatro filas (16 pocillos totales). Para el control de las 100 DICT de virus, se realizan 3 diluciones en base 10 a partir de la dilución de trabajo. Se siembran 75 μl por cuadruplicado de las 4 diluciones preparadas a las cuales se les agrega 75 μl de medio (ver figura 2).
- Realizar diluciones en base 4, pasando 25 μl , descartando los últimos 25 μl para todas las muestras y sueros controles.
- Se realiza un control de toxicidad de cada muestra colocando 75 μl de medio en otra placa.
- Preparar la dilución de trabajo de virus (100 DICT) en el medio de trabajo. Preparar el volumen necesario para todas las placas del ensayo considerando que se necesitan 8 ml de virus por placa.

- Colocar 75 μ l de la dilución de trabajo del virus en todas las placas, excepto en la placa de controles de toxicidad, en el control de células y en el control de 100 DICT.
- Incubar las placas (mezcla suero-virus) durante 1 hora a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ en atmósfera de CO_2 al $5 \pm 1\%$.
- Agregar sobre la mezcla suero-virus 100 μ l por pocillo, de la suspensión celular conteniendo 250.000 cel./ml en todas las placas.
- Incubar las placas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ en atmósfera de CO_2 al $5 \pm 1\%$, durante 48-72 hs.

5. Lectura

- Al cabo de las 48-72 horas la lectura se realiza por inspección de las monocapas al microscopio óptico.
- La lectura es por observación de efecto citopático. Se considera positivo aquel pocillo que presente un foco de CPE característico de BoHV-1. En los controles de toxicidad se debe observar la monocapa igual que los controles de células, libre de efecto citopático viral y libre de efecto tóxico.
- Si un suero determinado presenta toxicidad en las diluciones analizadas, el título de anticuerpos neutralizantes no podrá determinarse por esta técnica.

6. Aceptación del ensayo (CONFORMIDAD) El ensayo se considera conforme cuando:

6.1. Las monocapas de los controles de células se encuentran en buen estado (MC confluentes, células refringentes, sin alteraciones morfológicas, sin rastros de contaminación y sin CPE de BoHV-1).

6.2. El título de la suspensión viral debe contener 100 DICT 50%, con un rango admitido entre 50-200 DICT (ver tabla 1).

6.3. El control positivo debe dar el título esperado ± 1 pocillo. Ejemplo: $2.30 < 2.4 < 2.50$

6.4. El control negativo debe dar negativo. Se le coloca un valor arbitrario de 0.3 para los cálculos.

Figura 1. Diseño de placa de sueros problema

Placa N°	100 ul de Suspensión de células en todos los pocillos (250.000 cel/ml)												diluciones
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Muestra 1				Muestra 2				Muestra 3				8
B													32
C													128
D													512
E	Muestra 4				Muestra 5				Muestra 6				8
F													32
G													16
H													128
	Virus 100 DICT				Virus 100 DICT				Virus 100 DICT				512

Nota: Para el control de toxicidad de los sueros, una replica de cada dilución de los mismos deberá enfrentarse a la suspensión celular en una placa aparte.

Figura 2. Diseño de placa Control

Placa N°	100 ul de Suspensión de células en todos los pocillos (250.000 cel/ml)												diluciones
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Control positivo				Control negativo				Control células - medio de trabajo				8
B													32
C													128
D													512
E	Estándar positivo				Estándar negativo				Virus de trabajo (100 DICT)				Puro
F													-1
G													-2
H													-3
	Virus 100 DICT				Virus 100 DICT				4 replicas de cada dil de virus				

Tabla 1. Titulación de las 100 DICT de la suspensión de virus de trabajo

dil→	PURO	-1	-2	-3
1	+	+	+	-
2	+	+	-	-
3	+	+	-	-
4	+	+	-	-
DICT	50			

dil→	PURO	-1	-2	-3
1	+	+	+	-
2	+	+	+	-
3	+	+	-	-
4	+	+	-	-
DICT	100			

dil→	PURO	-1	-2	-3
1	+	+	+	-
2	+	+	+	-
3	+	+	+	-
4	+	+	-	-
DICT	150			

dil→	PURO	-1	-2	-3
1	+	+	+	-
2	+	+	+	-
3	+	+	+	-
4	+	+	+	-
DICT	200			

7. Interpretación

El título neutralizante del suero analizado se obtiene según la cantidad de replicadas protegidas en las diluciones seriadas en base al método de interpolación de Reed y Muench.

Tabla 2. Titulación de Ac en microplacas (log 10)

Pocillos Protegidos	1/8	1/32	1/128	1/512	1/2048	1/8192	1/32768	1/131072
1	0.70	1.30	1.90	2.50	3.10	3.70	4.30	4.90
2	0.90	1.50	2.10	2.70	3.30	3.90	4.50	5.10
3	1.10	1.70	2.30	2.90	3.90	4.10	4.70	5.30
4	1.20	1.80	2.40	3.00	4.10	4.20	4.80	5.40

Para validar el ensayo los sueros de los cobayos inmunizados con la vacuna de referencia deben dar un título promedio dentro del rango establecido como el valor promedio obtenido (luego de realizar 5 pruebas) \pm dos desvíos estándar.

8. Informe de resultados

Se informa el título de Ac anti-BoHV-1 neutralizantes obtenido según el método de Reed y Muench.

Las muestras negativas en la mínima dilución de suero ensayada (1/8) se expresan con un título arbitrario de 0.3 para los cálculos.

9. APROBACION DE LA PRUEBA DE POTENCIA EN COBAYO PARA IBR SEGUN SN

Se evaluarán todos los sueros de los animales inmunizados con la vacuna sometida a control. Se seleccionarán CINCO (5) de los sueros con mayor título obtenido y sobre ellos se realizará el promedio. Para la APROBACION de la vacuna sometida a control, el promedio de los títulos deberá ser mayor o igual a 1.31 por la técnica de SN para BoHV-1.