

ELISA

COMPETICIÓN FASE LIQUIDA (ELISA-CFL) Y SU USO EN CONTROL DE POTENCIA DE VACUNAS ANTIAFTOSA

Rossana M. Allende
PANAFTOSA - OPS/OMS

Los progresos realizados en tecnología de productos biológicos y la demanda por parte del consumidor de aumentar la relación calidad/precio, han impulsado no solamente un perfeccionamiento en las técnicas de control de calidad del producto final sino la implementación de sistemas de control de calidad del proceso de producción de los biológicos. En consecuencia el producto es totalmente monitoreado desde la materia prima utilizada en su producción hasta el producto final para consumo. Al ser empleado sistema de garantía de calidad durante el proceso de manufactura, el riesgo de obtener resultados negativos en el control del producto final se ha visto reducido o prácticamente eliminado para varios productos. Esta realidad permite que la calidad de los productos biológicos sea evaluada a través del control de puntos críticos del proceso de producción de los mismos, eliminándose la necesidad de una rutina de control de calidad sobre el producto final.

Si bien este sería el ideal de control de calidad, infelizmente, en lo que respecta a vacuna antiaftosa, aún no se ha logrado llegar a ese nivel y permanecemos aún aplicando metodologías y reglas de decisión para evaluar la calidad sobre una muestra del producto final. Es deseable que en un futuro cercano, todos los laboratorios de

producción de vacuna antiaftosa logren implementar sistemas de garantía de calidad. De esa manera será posible dar garantía de la calidad del producto no a partir del test sobre una muestra del producto final sino a partir de un conjunto de técnicas aplicadas al proceso de producción del biológico y que permiten un acompañamiento continuo de todas las etapas de producción.

A partir de entonces, será posible abandonar la rutina de control sobre el producto final, reservándose este para casos esporádicos y sobre el producto en el mercado.

Los productos biológicos presentan ciertas dificultades de control tanto en el proceso de producción como en el control de calidad final. Estas dificultades son originadas entre otras por:

1. no tienen una composición química definida, lo cual puede conducir a errores de producción
2. el único medio de evaluar cualitativamente y cuantitativamente el producto es midiendo el efecto que producen en un animal, y que solamente puede ser evaluada por técnicas específicas.

La metodología de referencia para evaluar la potencia de la vacuna antiaftosa en América del Sur (a partir de una muestra del producto final), es

la prueba de protección a la generalización podal (PGP) realizada en bovinos. En esta prueba se mide la inmunidad protectora que consiste, entre otros, en una interacción compleja entre anticuerpos, que varían en afinidad e isotipo, y células fagocíticas encargadas de los complejos antígeno-anticuerpos que se forman en el animal. Pruebas indirectas, realizadas *in vitro* han sido desarrolladas para identificar anticuerpos para el virus de fiebre aftosa en suero de animales vacunados. Para algunas de ellas, se ha establecido la correlación entre un determinado título serológico medido por la prueba en estudio y la respuesta al desafío en prueba de PGP. Una vez establecida dicha correlación, es posible utilizar estas pruebas como métrica para evaluar la potencia de vacunas antiaftosa.

El ELISA-competición en fase líquida (CFL) desarrollada por PANAFTOSA es una prueba indirecta, *in vitro*, para la cual se ha establecido la correlación con la respuesta en prueba de PGP para las cepas vacunales prototipo de América del Sur, O1 Campos, A24 Cruzeiro y C3 Indaial. Al igual que otras ELISAs tiene la ventaja de la facilidad de uso, bajo costo, reproducibilidad de resultados, minimizar el uso de animales (solo se toma la muestra de suero), usa reactivos inactivados (bajo riesgo), etc. A lo largo de la última década y aún en el presente con los avances obtenidos en los programas de control y erradicación de la fiebre aftosa, los países vienen realizando esfuerzos tendientes a reemplazar las pruebas de desafío directo en bovinos por pruebas *in vitro* que representan menor riesgo de eliminar virus infeccioso al ambiente.

ELISA-CFL

La prueba ELISA-CFL fue desarrollada en 1985 por Mc Cullough y col., en el Laboratorio Mundial de Referencia para Fiebre Aftosa (WRL, Pirbright, UK). La técnica fue inicialmente aplicada para caracterizar epitopes del virus de fiebre aftosa. En el año siguiente, también en el WRL,

Hamblin y col. (1986) adaptaron la prueba para medir anticuerpos pos infección o vacunación. Posteriormente, varios laboratorios adoptaron la metodología y en PANAFTOSA, fue adaptada la misma técnica para estudiar anticuerpos pos vacunación con cepas vacunales sudamericanas.

Además de reactivos comunes a otras pruebas ELISA, la prueba ELISA-CFL para identificación de anticuerpos de fiebre aftosa, requiere reactivos específicos. Estos son los anticuerpos de captura, los anticuerpos detectores y el antígeno de prueba. Los anticuerpos de captura, son preparados en conejo, por inmunización e hiperinmunización con virus de fiebre aftosa inactivado y purificado (140S). Los anticuerpos detectores son producidos en cobayo, por inmunización e hiper-inmunización con virus adaptado a la especie. El antígeno de prueba es sobrenadante de cultivos de células BHK infectados con los virus de fiebre aftosa correspondientes, clarificados e inactivados por tratamiento con BEI y controlados con un panel de anticuerpos monoclonales seleccionados para tal finalidad.

Todos los reactivos de prueba son testados para comprobar la inocuidad de los mismos con respecto a fiebre aftosa.

Esquemáticamente, la prueba ELISA-CFL consta de una “fase líquida” donde el suero en estudio es mezclado con el antígeno de prueba, luego de la cual se realiza el contacto con la fase sólida, el agregado del detector y conjugado en pasos separados y por último el substrato que da una reacción de color la cual permite leer la prueba a través de la medida de la densidad óptica del color desarrollado, para posterior interpretación. La prueba se realiza en microplacas de poliestireno (fase sólida) específicas para pruebas de ELISA y cada placa de prueba lleva, además de los sueros en estudio, controles de calidad internos. Estos controles internos consisten en sueros positivos y negativo para el antígeno de prueba; control de color

de fondo o blanco de prueba (0% color) y control de máximo color de prueba o antígeno.

En el subproyecto “Correlación de técnicas de control de vacuna antiaftosa” realizado por Cuenca del Plata, PANAFTOSA y Comunidad Económica Europea, fue evaluado el comportamiento del ELISA-CFL desarrollada por PANAFTOSA, frente a la respuesta de bovinos vacunados y desafiados en la prueba de PGP. La colección de sueros de bovinos vacunados a ser estudiada fue definida de común acuerdo por un grupo de consultores de Argentina, Brasil, Uruguay, PANAFTOSA y CEE. La misma estaba formada por sueros de bovinos vacunados con vacunas comerciales y sometidos a prueba oficial de control de potencia por desafío en PGP. La metodología de estudio fue la titulación de los sueros en prueba ELISA-CFL, registro de resultados de PGP y título serológico para cada individuo,

análisis estadístico y determinación de EPP para O1Campos, A24 Cruzeiro y C3 Indaial (Tablas 2, 3, 4).

Fue utilizado el modelo de regresión, como metodología estadística para analizar el conjunto de datos obtenidos de la realización de las pruebas PGP y ELISA-CFL en bovinos vacunados con vacuna trivalente de formulación oleosa. A partir de un título serológico, el modelo de regresión nos permite asociar la probabilidad de ese bovino estar protegido o no a la descarga en PGP. Así se establecieron las expectativas de protección (EPP) para cada título serológico en bovinos vacunados con vacuna trivalente (O1Campos, A24Cruzeiro, C3Indaial) de formulación oleosa.

Se generaron tablas de EPP para cada valencia estudiada. Dichas tablas constituyen un instrumento a ser utilizado para estimar la potencia de una vacuna. El instrumento por si solo no nos permite evaluar la vacuna, es necesario

TABLA 2
Expectativas Porcentuales de Protección (EPP) - Virus O₁ Campos

ELISA Policlinal													
Título	EPP	Título	EPP	Título	EPP	Título	EPP	Título	EPP	Título	EPP	Título	EPP
0.58	0.21	1.00	2.25	1.42	20.25	1.84	73.69	2.26	96.86	2.68	99.71	3.10	99.97
0.60	0.23	1.02	2.52	1.44	22.16	1.86	75.84	2.28	97.19	2.70	99.74	3.12	99.98
0.62	0.26	1.04	2.81	1.46	24.19	1.88	77.88	2.30	97.49	2.72	99.77	3.14	99.98
0.64	0.29	1.06	3.14	1.48	26.35	1.90	79.78	2.32	97.75	2.74	99.79	3.16	99.98
0.66	0.33	1.08	3.51	1.50	28.63	1.92	81.56	2.34	97.99	2.76	99.81	3.18	99.98
0.68	0.37	1.10	3.92	1.52	31.02	1.94	83.22	2.36	98.21	2.78	99.83	3.20	99.98
0.70	0.41	1.12	4.37	1.54	33.51	1.96	84.76	2.38	98.40	2.80	99.85	3.22	99.99
0.72	0.46	1.14	4.87	1.56	36.11	1.98	86.18	2.40	98.57	2.82	99.87	3.24	99.99
0.74	0.52	1.16	5.43	1.58	38.78	2.00	87.48	2.42	98.72	2.84	99.88	3.26	99.99
0.76	0.58	1.18	6.05	1.60	41.53	2.02	88.68	2.44	98.86	2.86	99.90	3.28	99.99
0.78	0.65	1.20	6.73	1.62	44.33	2.04	89.78	2.46	98.98	2.88	99.91	3.30	99.99
0.80	0.73	1.22	7.49	1.64	47.17	2.06	90.78	2.48	99.09	2.90	99.92	3.32	99.99
0.82	0.82	1.24	8.32	1.66	50.02	2.08	91.70	2.50	99.19	2.92	99.93	3.34	99.99
0.84	0.91	1.26	9.23	1.68	52.88	2.10	92.53	2.52	99.27	2.94	99.93	3.36	99.99
0.86	1.02	1.28	10.24	1.70	55.71	2.12	93.28	2.54	99.35	2.96	99.94	3.38	99.99
0.88	1.15	1.30	11.34	1.72	58.51	2.14	93.96	2.56	99.42	2.98	99.95	3.40	100.00
0.90	1.28	1.32	12.54	1.74	61.26	2.16	94.58	2.58	99.48	3.00	99.95	3.42	100.00
0.92	1.44	1.34	13.84	1.76	63.93	2.18	95.14	2.60	99.54	3.02	99.96	3.44	100.00
0.94	1.61	1.36	15.27	1.78	66.53	2.20	95.64	2.62	99.59	3.04	99.96	3.46	100.00
0.96	1.80	1.38	16.80	1.80	69.02	2.22	96.09	2.64	99.63	3.06	99.97	3.48	100.00
0.98	2.01	1.40	18.46	1.82	71.41	2.24	96.50	2.66	99.67	3.08	99.97	3.50	100.00

TABLA 3

Expectativas Porcentuales de Protección (EPP) - Virus A₂₄ Cruzeiro.

ELISA Policlonal													
Título	EPP	Título	EPP	Título	EPP	Título	EPP	Título	EPP	Título	EPP	Título	EPP
0.58	0.03	1.00	0.42	1.42	6.29	1.84	51.69	2.26	94.46	2.68	99.63	3.10	99.98
0.60	0.03	1.02	0.48	1.44	7.12	1.86	54.97	2.28	95.11	2.70	99.68	3.12	99.98
0.62	0.03	1.04	0.55	1.46	8.04	1.88	58.21	2.30	95.69	2.72	99.72	3.14	99.98
0.64	0.04	1.06	0.62	1.48	9.07	1.90	61.38	2.32	96.20	2.74	99.75	3.16	99.98
0.66	0.04	1.08	0.71	1.50	10.21	1.92	64.45	2.34	96.65	2.76	99.78	3.18	99.99
0.68	0.05	1.10	0.81	1.52	11.49	1.94	67.41	2.36	97.06	2.78	99.81	3.20	99.99
0.70	0.06	1.12	0.92	1.54	12.90	1.96	70.24	2.38	97.41	2.80	99.83	3.22	99.99
0.72	0.07	1.14	1.05	1.56	14.45	1.98	72.92	2.40	97.72	2.82	99.85	3.24	99.99
0.74	0.08	1.16	1.20	1.58	16.16	2.00	75.44	2.42	98.00	2.84	99.87	3.26	99.99
0.76	0.09	1.18	1.36	1.60	18.03	2.02	77.80	2.44	98.24	2.86	99.89	3.28	99.99
0.78	0.10	1.20	1.55	1.62	20.06	2.04	80.00	2.46	98.46	2.88	99.90	3.30	99.99
0.80	0.11	1.22	1.76	1.64	22.26	2.06	82.02	2.48	98.64	2.90	99.91	3.32	99.99
0.82	0.13	1.24	2.01	1.66	24.62	2.08	83.89	2.50	98.81	2.92	99.92	3.34	100.00
0.84	0.15	1.26	2.29	1.68	27.15	2.10	85.59	2.52	98.95	2.94	99.93	3.36	100.00
0.86	0.17	1.28	2.60	1.70	29.83	2.12	87.14	2.54	99.08	2.96	99.94	3.38	100.00
0.88	0.19	1.30	2.95	1.72	32.67	2.14	88.55	2.56	99.19	2.98	99.95	3.40	100.00
0.90	0.22	1.32	3.36	1.74	35.63	2.16	89.82	2.58	99.29	3.00	99.96	3.42	100.00
0.92	0.25	1.34	3.81	1.76	38.71	2.18	90.96	2.60	99.38	3.02	99.96	3.44	100.00
0.94	0.28	1.36	4.33	1.78	41.88	2.20	91.99	2.62	99.46	3.04	99.97	3.46	100.00
0.96	0.32	1.38	4.90	1.80	45.12	2.22	92.91	2.64	99.52	3.06	99.97	3.48	100.00
0.98	0.37	1.40	5.56	1.82	48.40	2.24	93.73	2.66	99.58	3.08	99.97	3.50	100.00

TABLA 4

Expectativas Porcentuales de Protección (EPP) - Virus C3 Indaiatã
Elisa Policlonal

Título	EPP	Título	EPP	Título	EPP	Título	EPP	Título	EPP	Título	EPP	Título	EPP	Título	EPP
0.40	0.47	0.88	2.84	1.30	15.37	1.72	53.03	2.14	87.53	2.56	97.76	2.98	99.63	3.40	99.94
0.40	0.51	0.90	3.09	1.32	16.53	1.74	55.19	2.16	88.45	2.58	97.94	3.00	99.66	3.42	99.95
0.50	0.56	0.92	3.36	1.34	17.77	1.76	57.33	2.18	89.31	2.60	98.11	3.02	99.69	3.44	99.95
0.52	0.61	0.94	3.65	1.36	19.08	1.78	59.44	2.20	90.11	2.62	98.27	3.04	99.72	3.46	99.95
0.54	0.66	0.96	3.97	1.38	20.45	1.80	61.52	2.22	90.86	2.64	98.41	3.06	99.74	3.48	99.96
0.56	0.72	0.98	4.32	1.40	21.91	1.82	63.56	2.24	91.56	2.66	98.54	3.08	99.76	3.50	99.96
0.58	0.79	1.00	4.69	1.42	23.43	1.84	65.55	2.26	92.21	2.68	98.66	3.10	99.78	3.52	99.96
0.60	0.86	1.02	5.10	1.44	25.03	1.86	67.49	2.28	92.81	2.70	98.77	3.12	99.80	3.54	99.97
0.62	0.93	1.04	5.53	1.46	26.70	1.88	69.37	2.30	93.37	2.72	98.87	3.14	99.82	3.56	99.97
0.64	1.02	1.06	6.01	1.48	28.43	1.90	71.19	2.32	93.89	2.74	98.96	3.16	99.83	3.58	99.97
0.66	1.11	1.08	6.52	1.50	30.24	1.92	72.94	2.34	94.37	2.76	99.05	3.18	99.85	3.60	99.98
0.68	1.21	1.10	7.07	1.52	32.10	1.94	74.62	2.36	94.81	2.78	99.13	3.20	99.86	3.62	99.98
0.70	1.32	1.12	7.69	1.54	34.03	1.96	76.23	2.38	95.23	2.80	99.20	3.22	99.87	3.64	99.98
0.72	1.43	1.14	8.30	1.56	36.01	1.98	77.77	2.40	95.61	2.82	99.27	3.24	99.88	3.66	99.98
0.74	1.56	1.16	8.99	1.58	38.04	2.00	79.24	2.42	95.96	2.84	99.33	3.26	99.89	3.68	99.98
0.76	1.70	1.18	9.72	1.60	40.11	2.02	80.64	2.44	96.28	2.86	99.38	3.28	99.90	3.70	99.98
0.78	1.85	1.20	10.51	1.62	42.22	2.04	81.96	2.46	96.58	2.88	99.43	3.30	99.91	3.72	99.99
0.80	2.02	1.22	11.36	1.64	44.35	2.06	83.21	2.48	96.86	2.90	99.48	3.32	99.92	3.74	99.99
0.82	2.20	1.24	12.27	1.66	46.51	2.08	84.39	2.50	97.11	2.92	99.52	3.34	99.92	3.76	99.99
0.84	2.24	1.26	13.24	1.68	48.68	2.10	85.50	2.52	97.35	2.94	99.56	3.36	99.93	3.78	100.00
0.86	2.61	1.28	14.27	1.70	50.85	2.12	86.55	2.54	97.56	2.96	99.60	3.38	99.94	4.00	100.00

definir la metodología y regla de decisión deseada para juzgar la potencia del biológico utilizando como métrica el ELISA-CFL/EPP.

Evaluación de la potencia de vacuna antiaftosa

La prueba considerada “gold standard” para evaluar la potencia de la vacuna antiaftosa es la prueba directa de protección a la generalización podal (PGP) (Vianna Filho y col., 1993). La regla de decisión recomendada para juzgar la potencia de la vacuna antiaftosa en PGP acepta hasta cuatro animales no protegidos (con lesiones de generalización) en una muestra de 16 bovinos vacunados con la vacuna en prueba. A esta proporción de 12 protegidos en el grupo de 16 animales en prueba, corresponde estadísticamente un intervalo de confianza al 95% de la distribución Binomial de 47.62;92.73 (Tabla 1).

TABLA 1
LÍMITES DE CONFIANZA EXACTOS DE LA DISTRIBUCIÓN BINOMIAL

Protegidos en la muestra de 16 animales		Intervalo de Confianza de la Potencia de la vacuna	
Número	Porcentaje	95%	99%
0	0.00	0.00-20.590.	0.00-28.19
1	6.25	0.16-30.23	0.03-38.14
2	12.50	1.55-38.35	0.67-46.28
3	18.75	4.05-45.65	2.23-53.44
4	25.00	7.27-52.83	4.55-59.91
5	31.25	11.02-58.66	7.45-65.85
6	37.50	15.20-64.57	10.86-71.32
7	43.75	19.75-70.12	14.71-76.38
8	50.00	24.65-75.35	18.97-81.03
9	56.25	29.88-80.25	23.62-85.29
10	62.50	35.43-84.80	28.68-89.14
11	68.75	41.34-88.98	34.15-92.55
12	75.00	47.62-92.73	40.09-95.45
13	81.25	54.35-95.95	46.56-97.77
14	87.50	61.65-98.45	53.72-99.33
15	93.75	69.77-99.84	61.86-99.97
16	100.00	79.41-100.00	71.81-100.00

Al proponer el uso del ELISA-CFL/EPP como métrica para evaluar la potencia de la vacuna, es necesario definir la metodología y regla de decisión que se desea adoptar.

En el año 1996 PANAFTOSA recomendó una metodología de control de potencia que incluía el uso de 30 bovinos vacunados en prueba y el ELISA-CFL/EPP como métrica para estimar la potencia del biológico. La regla de decisión recomendada fue que el promedio de EPP del grupo de 30 bovinos vacunados con la vacuna en prueba tuviera un LIC de 75%.

Estudios posteriores, en los dos últimos años, permitieron el análisis y revisión de las reglas de decisión recomendadas para las diferentes métricas (PGP y ELISA-CFL/EPP). Se llegó a la conclusión de que la vacuna controlada y aprobada en prueba de PGP, con la regla de decisión antes mencionada (12/16), y que ha sido utilizada conforme una estrategia epidemiológica y en condiciones adecuadas, ha permitido grandes avances en el control de la enfermedad en el campo, incluso su erradicación en algunas regiones. Este parámetro nos indica que el nivel de calidad recomendado para aprobar la vacuna por PGP, nos da garantía de la liberación al consumidor de un producto eficaz, siempre que tratado y aplicado en las condiciones adecuadas, para ser utilizado en programas de control de la enfermedad.

Por otro lado, para atender a los niveles de exigencia propuestos en 1996 (LIC 75%), los laboratorios productores del biológico han introducido modificaciones en la formulación de la vacuna, entre ellas la concentración del antígeno vacunal lo que puede acarrear concentración de proteínas no deseables en el producto final. Estas modificaciones, a su vez, podrían traducirse en algunos casos en reacciones pos vacunales indeseables o interferencia con pruebas serológicas de utilización en vigilancia epidemiológica.

Teniendo en consideración lo expresado en los dos últimos párrafos, PANAFTOSA ha modificado su recomendación en cuanto a la regla de decisión a ser aplicada cuando se usa como métrica el ELISA-CFL/EPP para estimar la potencia de la vacuna antiaftosa. La propuesta actual tiende a equiparar la regla de decisión recomendada cuando se usa el ELISA-CFL/EPP a la recomendada cuando se usa la PGP, y al mismo tiempo aumentar la precisión del resultado del test, disminuyendo los riesgos del productor del biológico y del consumidor del biológico.

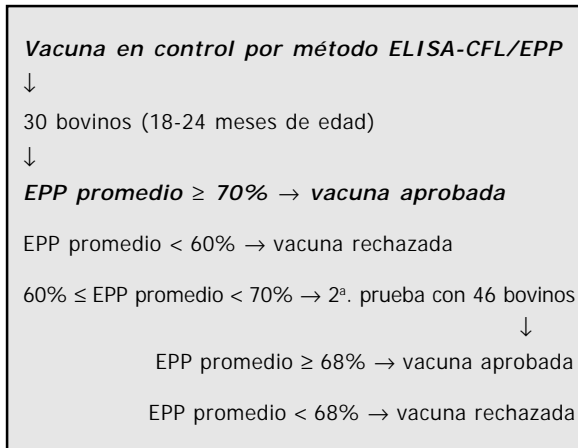
Para alcanzar estos objetivos se propone utilizar como metodología para juzgar la potencia de la vacuna por prueba ELISA-CFL/EPP, un número de 30 bovinos vacunados y dos controles (sin vacunar). Los bovinos deberán ser seleccionados con el mismo criterio que para prueba de PGP. Cuatro semanas pos vacunación, se tomarán muestras de suero de todos los animales y se determinara el nivel de anticuerpos para los serotipos O1Campos, A24 Cruzeiro y C3 Indaial utilizando la prueba ELISA-CFL. A partir de cada título individual se calculara la EPP correspondiente y el promedio de EPP del grupo de 30 animales vacunados. La regla de decisión propuesta para juzgar una vacuna como de buena calidad para uso en programas de control de la enfermedad en el campo, es que la misma debe presentar un promedio de EPP del grupo de 70%. Estadísticamente, a este promedio de EPP le corresponde un IC 50,60;85,27 lo cual nos permite equipararnos con el nivel considerado “buena calidad” por la PGP (Tabla 5, Fig. 1). Vacunas con promedio de EPP (del grupo de 30 bovinos) inferior a 60% serán rechazadas. Aquellas que presenten un promedio de EPP (del grupo de 30 bovinos) inferior a 70% pero superior o igual a 60% tendrán derecho a una segunda etapa de control. En la segunda etapa, serán

vacunados 16 nuevos bovinos con la misma vacuna en prueba y luego de cuatro semanas se determinará el nivel de anticuerpos de la misma forma en que se estudiaron los 30 sueros anteriores. El promedio de EPP será entonces calculado sobre las 46 EPPs individuales. Vacunas con promedio de EPP (del grupo de 46 animales) igual o superior a 68% serán aprobadas. Vacunas con promedio de EPP inferior a 68% serán rechazadas.

TABLA 5
LÍMITES DE CONFIANZA EXACTOS DE
LA DISTRIBUCIÓN BINOMIAL

Tamaño del Grupo	Proporción de Protegidos	Intervalo de Confianza para la potencia de la vacuna	
		95%	99%
30	33.33	17.29-52.81	13.67-58.34
	40.00	22.66-59.40	18.50-64.70
	50.00	31.30-68.70	26.48-73.52
	60.00	40.60-77.34	35.30-81.90
	63.33	43.86-80.97	38.43-83.96
	66.67	47.19-82.71	41.66-86.33
	70.00	50.60-85.27	44.99-88.58
	73.33	54.11-87.27	48.44-90.71
	76.67	57.72-90.07	52.01-92.71
	85.53	69.28-94.36	63.66-97.67
46	50.00	34.90-65.10	30.79-69.21
	56.52	41.11-71.01	36.77-74.89
	60.87	45.37-74.91	40.93-78.51
	69.57	54.25-82.26	49.67-85.31
	71.74	56.54-84.01	51.96-86.90
	73.91	58.87-85.73	54.28-88.46
	76.09	61.23-87.41	56.66-89.96
	78.26	63.64-89.05	59.08-91.41
	80.43	66.09-90.64	61.56-92.80
	84.78	71,13-93,66	66,71-95,37

Esquemáticamente se propone:



Cualquier variación en el número de bovinos en prueba (disminución o aumento) requiere determinar el promedio de EPP a ser exigido de manera que atienda a la regla de decisión escogida. A su vez será necesario determinar, conforme la metodología usada, los riesgos del productor del biológico y del consumidor (Fig. 1) y llegar a un consenso entre las 3 partes involucradas (laboratorio productor, laboratorio controlador y programa de salud animal) en lo que respecta a los riesgos que involucra (para el productor y para el consumidor) la metodología elegida para juzgar la potencia de la vacuna antiaftosa.

Transferencia de tecnología ELISA-CFL/EPP y sistemas de control de calidad

PANAFTOSA en su calidad de Laboratorio de Referencia en control de vacuna antiaftosa a realizado la transferencia de la tecnología descrita a los laboratorios nacionales de control de vacuna antiaftosa. Dicha transferencia se realiza en un programa de cooperación técnica con los países a través de cursos regionales, entrenamiento en servicio, asesoría directa y producción, control y distribución de reactivos específicos.

La metodología cuenta con un sistema de control de calidad en dos niveles: 1) interno; realizado en cada placa de prueba y que consiste en la inclusión de sueros controles conocidos que se trabajan en diluciones y para los cuales han sido determinados los límites inferior y superior del título, aceptables para cada uno. Se incluye además un control de antígeno y de blanco de la prueba en cada placa procesada. El segundo nivel de control es el 2) externo, cuyo objetivo final es evaluar el desempeño de los laboratorios en el uso de la ELISA-CFL para titular anticuerpos en sueros bovinos. Consideramos objetivos intermedios del control externo al análisis de la repetibilidad de la prueba en el laboratorio y de la reproducibilidad de la misma entre laboratorios. La metodología empleada para este control externo requiere la preparación y distribución de colecciones codificadas de sueros bovinos con diferentes niveles de anticuerpos de fiebre aftosa. Dichas colecciones son distribuidas a los países para la titulación de los sueros en los laboratorios participantes y posterior envío de los resultados a PANAFTOSA. A continuación se realiza en PANAFTOSA, la decodificación de la identificación de los sueros y el análisis estadístico de los resultados y finalmente la comunicación de los resultados a los laboratorios participantes.

Las rondas de control de calidad externo están dirigidas a los Laboratorios Oficiales de control de vacuna antiaftosa y a PANAFTOSA. Se propone repetirlas con una frecuencia anual. Mediante la aplicación de estos sistemas de control de calidad sobre la prueba ELISA-CFL será posible identificar puntos que deben ser mejorados y tomar las acciones pertinentes para optimizar los resultados obtenidos mediante el empleo de la técnica ELISA-CFL en la red de laboratorios de control de vacuna del continente.

BIBLIOGRAFIA

- ALONSO, A.; Darsie, G.C.; Teixeira, A.C.; Reis, J.L.; Mesquita, J.A. (1994). *Application of monoclonal antibodies to quality control of foot-and-mouth disease vaccines*. *Vaccine* 12:682-686.
- FAO (1997). *Vaccine Manual. The Production and quality control of veterinary vaccines for use in developing countries*.
- HAMBLIN, C.; Barnett, I.T.R.; Crowther, J.R. (1986). *A new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus*. II Application. *J. Immunol Methods* 93:123-129.
- Mc CULLOUGH, K.C.; Crowther, J.R.; Butcher, R.N. (1985). *A liquid-phase ELISA and its use in the identification of epitopes on foot-and-mouth disease virus antigen*. *J Virol Methods* 11:329-338.
- OIE (2000). *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines*.
- PANAFTOSA. *Sub-proyecto para la correlación de las técnicas de control de potencia de las vacunas contra la fiebre aftosa en los países de la cuenca del Río de la Plata*. Cooperación de la Comunidad Económica Europea con Argentina, Brasil y Uruguay a través del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa/OPS.
- VIANNA Filho, Y.L.; Astudillo, V.; Gomes, I.; Fernández, G.; Rozas, C.E.E.; Ravison, J.A.; Alonso, A. (1993). *Potency control of foot-and-mouth disease vaccine in cattle*. Comparison of the 50% protective dose and the protection against generalization. *Vaccine* 11:1424-1428.

Este documento fue preparado como soporte a la presentación realizada en el VII Seminario Internacional de Vacuna Antiaftosa, PANAFOTSA - OPS/OMS.