

**ESTIMACION DE POTENCIA DE VACUNAS CONTRA LA FIEBRE AFTOSA DE ACUERDO CON LOS RESULTADOS DE PRUEBAS DE ANTICUERPOS**

*P. Sutmöller<sup>1</sup>, Ivo Gomes<sup>1</sup>, V.M. Astudillo<sup>1</sup>*

**COMUNICACION BREVE**

La prueba de seroprotección para la detección de anticuerpos contra la fiebre aftosa ha sido utilizada por el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (CPFA) desde principios de la década de 50 (7). En esta prueba, ratones de 6 a 7 días de edad son inoculados por vía subcutánea con 0,1 ml de suero bovino inactivado y la inoculación del virus se realiza aproximadamente una hora más tarde. El índice de seroprotección (ISP) es la diferencia dada por el logaritmo del título del virus en el suero de ratones tratados y por el de ratones control sin tratar. En 1975, Gomes y Astudillo (2) publicaron un cuadro con los valores de los índices de seroprotección y sus correspondientes expectativas porcentuales de protección (EPP) basados en los signos clínicos de 701 bovinos desafiados por inoculación del virus en la lengua a los 21-28 días después de la inoculación y de 161 bovinos sin vacunar (Cuadro 1).

**CUADRO 1. Expectativa porcentual de protección. (Prueba de seroprotección)**

ISP <sup>a</sup>	%	ISP	%	ISP	%	ISP	%
0.0	20	1.0	51	2.0	81	3.0	96
0.1	23	1.1	55	2.1	84	3.1	97
0.2	25	1.2	58	2.2	86	3.2	97
0.3	28	1.3	61	2.3	87	3.3	98
0.4	31	1.4	65	2.4	89	3.4	98
0.5	34	1.5	68	2.5	91	3.5	98
0.6	38	1.6	71	2.6	92	3.6	99
0.7	41	1.7	74	2.7	93	3.7	99
0.8	44	1.8	76	2.8	94	3.8	99
0.9	48	1.9	79	2.9	95	3.9	99

<sup>a</sup>ISP = Índice de seroprotección (Gomes y Astudillo, 2).

Posteriormente Sutmöller *et al.* (5) realizaron un estudio similar en cerca de 500 sueros de bovinos vacunados utilizando los resultados de la prueba de neutralización del virus de la fiebre aftosa en microplacas, de acuerdo con lo descrito por Ferreira (3). Los resultados se expresaron como la recíproca del logaritmo de la dilución del suero que neutraliza aproximadamente 100 DI<sub>50</sub> de virus. En el Cuadro 2 se muestran las EPP de los títulos de neutralización.

**CUADRO 2. Expectativa porcentual de protección. (Prueba de neutralización)**

TN <sup>a</sup>	%	TN	%	TN	%	TN	%
0.1	08	1.1	30	2.1	71	3.1	92
0.2	09	1.2	34	2.2	74	3.2	93
0.3	10	1.3	38	2.3	77	3.3	94
0.4	11	1.4	42	2.4	80	3.4	95
0.5	13	1.5	46	2.5	82	3.5	95
0.6	15	1.6	50	2.6	84	3.6	96
0.7	17	1.7	56	2.7	86	3.7	96
0.8	19	1.8	60	2.8	88	3.8	98
0.9	22	1.9	64	2.9	90	3.9	99
1.0	26	2.0	68	3.0	91	4.0	99

<sup>a</sup>TN = Título de neutralización (Sutmöller *et al.*, 5).

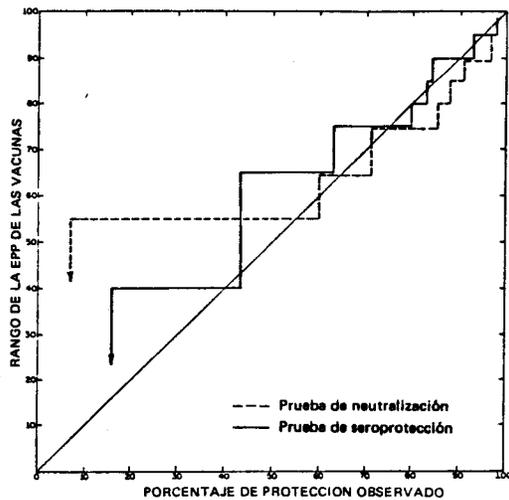
En este estudio, un total de 62 series de vacuna sin dilución o diluidas fueron clasificadas de acuerdo con el promedio de las EPP de los bovinos, determinadas por ambos métodos a los 21-28 días posvacunación (DPV). Los resultados fueron comparados con la protección observada a la inoculación de virus en la lengua a los 21-28 DPV (Cuadro 3). Estos resultados se muestran gráficamente en la Fig. 1.

Se puede observar que hay una buena relación entre la clasificación y la protección conferida con las vacunas que tienen una media de EPP superior a 60%, y que la prueba de neutralización subestima

<sup>1</sup>Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS), Caixa Postal 589, 20001 Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

**CUADRO 3. Clasificación de vacunas contra la fiebre aftosa de acuerdo con la media de la expectativa porcentual de protección (EPP) y la protección del bovino frente al desafío**

Rango de la media de la EPP	Nº de vacunas	Protección observada	
		Nº Proteg./probados	%
<b>Prueba de neutralización</b>			
< 55	6	3/30	7
55-65	6	26/43	60
66-75	8	38/53	71
76-80	10	70/81	86
81-85	14	92/105	88
86-90	13	95/105	91
91-95	5	33/34	97
<b>Totales</b>	<b>62</b>	<b>357/451</b>	
<b>Prueba de seroprotección</b>			
< 40	5	4/25	16
41-65	7	18/42	43
66-75	7	30/48	63
76-80	3	20/25	80
81-85	4	33/40	83
86-90	11	62/74	84
91-95	8	55/59	93
96-99	17	135/138	98
<b>Totales</b>	<b>62</b>	<b>357/451</b>	



**FIGURA 1. Clasificación de vacunas contra la fiebre aftosa de acuerdo con la media de la expectativa porcentual de protección (EPP) y la protección del bovino frente al desafío. Representación gráfica del Cuadro 3.**

levemente la protección observada. En los grupos de bovinos con una media de EPP menor de 60%, generalmente hay varios sueros sin títulos finales debido a que la prueba se realiza de forma rutinaria; por tanto, estos grupos son clasificados más altos de lo que son realmente.

De acuerdo con el Cuadro 3, los resultados de las pruebas de seroprotección y de neutralización clasificaron un número aproximadamente igual de vacunas de baja calidad con una EPP de 75% o menor. Con la prueba de seroprotección hay más vacunas con una EPP de 85% o más que con la prueba de neutralización. En el rango intermedio esta situación se invirtió, probablemente como consecuencia de la subestimación de la potencia de la vacuna por la prueba de neutralización.

Al respecto surge la pregunta si siempre se puede utilizar la EPP en el control de vacuna como una alternativa para la prueba de desafío de bovinos una vez que la relación entre la EPP individual por un determinado sistema se establezca.

Supóngase que el valor de aprobación de una vacuna antiaftosa es 75% de protección de los bovinos vacunados con un nivel de confianza de 95% frente al desafío o a cualquier otro método comparable. En este caso, una vacuna con un intervalo unilateral (promedio EPP -  $t_{0.05}(n-1) \times E.E.EPP$ ) igual o superior a 75% podría alcanzar este requerimiento donde  $t_{0.05}(n-1)$  es el valor t-Student, n es el número de animales y EE el error estándar de la media de la EPP. En otras palabras, en 20 pruebas de esta misma vacuna, usando la misma población bovina, se esperaría aprobación en 19 veces.

Para eliminar la influencia de la variación del tamaño del grupo se agruparon los resultados de pruebas serológicas (Cuadro 3) con una EPP de rango similar para simular pruebas de vacunas utilizando un número uniforme de 12 bovinos. Se calcularon la media de la EPP y el error estándar de estas vacunas simuladas (Cuadro 4). Se puede observar que 20 vacunas podrían ser aprobadas por la prueba de neutralización y 24 por la prueba de seroprotección. El error estándar de la EPP de la prueba de neutralización en el rango de 70-90% es considerablemente menor que el error

CUADRO 4. Media de la expectativa porcentual de protección (EPP) de grupos de 12 bovinos y valor de aprobación de la vacuna

Vacuna Nº	Prueba de neutralización				Dif.VA <sup>c</sup> LIC	Vacuna Nº	Prueba de seroprotección			
	Media EPP	EE <sup>a</sup>	LIC <sup>b</sup>	Dif.VA <sup>c</sup> LIC			Media EPP	EE	LIC	Dif.VA LIC
01	74.8	4.1	67.4	-7.6		29	73.8	6.7	61.8	-13.2
02	77.3	3.6	70.8	-4.2		30	79.8	3.5	73.5	-1.5
03	78.3	2.8	73.3	-1.7		31	81.3	4.2	73.8	-1.2
04	78.4	2.7	73.6	-1.4						
05	78.8	2.7	74.0	-1.0		32	84.3	4.5	76.2	1.2
06	79.2	3.4	73.1	-1.9		33	86.5	4.6	78.2	3.2
07	79.3	3.1	73.7	-1.3		34	87.1	4.0	79.9	4.9
08	80.4	4.1	73.0	-2.0		35	87.4	4.2	79.9	4.9
						36	87.7	5.9	77.1	2.1
09	80.4	2.6	75.7	0.7		37	87.8	4.0	80.6	5.6
10	81.4	1.4	78.9	3.9		38	91.4	3.5	85.1	10.1
11	81.9	3.7	75.3	0.3		39	91.8	3.1	86.2	11.2
12	83.7	2.6	79.0	4.0		40	92.6	3.2	86.9	11.9
13	83.8	1.7	80.7	5.7		41	93.6	2.3	89.5	14.5
14	84.1	2.9	78.9	3.9		42	93.9	1.7	90.8	15.8
15	84.9	2.8	79.9	4.9		43	95.0	1.2	92.8	17.8
16	85.0	1.9	81.6	6.6		44	95.0	1.9	91.6	16.6
17	85.0	3.3	79.1	4.1		45	95.4	1.9	92.0	17.0
18	85.1	2.3	81.0	6.0		46	95.6	0.7	94.3	19.3
19	87.7	2.5	83.2	8.2		47	96.1	2.1	92.3	17.3
20	87.0	2.2	83.0	8.0		48	97.0	1.7	93.9	18.9
21	87.9	2.8	82.9	7.9		49	97.3	0.6	96.2	21.2
22	88.9	1.3	86.6	11.6		50	97.3	0.9	95.7	20.7
23	89.8	1.5	87.1	12.1		51	97.6	1.1	95.6	20.6
24	90.2	1.2	88.0	13.0		52	97.8	1.0	96.0	21.0
25	90.2	1.0	88.4	13.4		53	98.3	0.7	97.0	22.0
26	92.2	1.4	89.7	14.7		54	98.4	0.6	97.3	22.3
27	92.3	1.3	90.0	15.0		55	98.8	0.1	98.6	23.6
28	94.8	1.2	92.6	17.6						

<sup>a</sup> EE = Error estándar.

<sup>b</sup> Límite inferior de confianza = media EPP -  $t_{0.05}$  x EE. Para 11 grados de libertad  $t_{0.05} = 1.796$  (4).

<sup>c</sup> Diferencia entre el valor de aprobación (75%) y el límite inferior de confianza. Si este valor es negativo la vacuna no reúne los requerimientos mínimos.

estándar de las EPP de la prueba de seroprotección. Por lo tanto, vacunas con igual EPP evaluadas por la prueba de neutralización tienen mejor probabilidad de pasar.

Hay dos factores básicos que determinan el tamaño del error estándar de una media. Uno es el número de animales en la prueba y el otro es la varianza de la respuesta. Grupos mayores y

respuestas más homogéneas resultan en un error estándar menor de la media y, consecuentemente bajo estas condiciones, las vacunas próximas al valor crítico tienen más probabilidad de ser aprobadas. Además, una vacuna con una media de EPP adecuada, pero con una respuesta muy variable de los animales, corre mayor riesgo de ser rechazada. Las vacunas 8 y 9 del Cuadro 4 ilustran

estas observaciones. Cuando ambas vacunas se combinaron y se aplicaron en un grupo de 24 bovinos, la media de la EPP permaneció en 80,4 pero el error estándar de la media disminuyó a 2,4 y entonces la vacuna pasó en la prueba. Ocurrió lo mismo con las vacunas 31 y 32 (Cuadro 4) que, al combinarlas dieron una media de EPP de 82,8% y un error estándar de 3.

Por tanto, la influencia del tamaño del grupo y la variabilidad de la respuesta de los animales son dos factores importantes a considerar en cualquier tipo de prueba de potencia. La obtención de bovinos para pruebas de potencia que reúnan condiciones uniformes de edad, estado de nutrición o historia genética es bastante difícil y, en consecuencia, pueden responder de forma diferente a un estímulo inmunogénico. Sin embargo, el elevado costo de los bovinos para las pruebas de comprobación ha creado la tendencia a utilizar grupos cada vez menores. En los ensayos de anticuerpos ocurre lo mismo con referencia a la uniformidad de los bovinos vacunados, pero se pueden utilizar grupos mayores a un costo reducido y cada animal puede ser probado para detectar anticuerpos contra cada una de las cepas usadas en la vacuna.

Las pruebas de comprobación requieren establos de aislamiento costosos que, lamentablemente, no siempre han sido satisfactorios para prevenir escape de grandes cantidades de aerosoles infectivos generados por los animales enfermos. Además, la eliminación de los animales al finalizar las pruebas ocasiona un importante problema sanitario. No ocurre lo mismo con los ensayos de anticuerpos de sueros procedentes de animales enfermos que sólo son realizados en laboratorios, disminuyendo el riesgo de escape de los virus.

Finalmente, una prueba de anticuerpos puede ser fácilmente repetida sin prácticamente ningún costo adicional y, si fuese necesario, se podrían incluir en la prueba otras cepas de virus.

Por tanto, los ensayos de anticuerpos con resultados expresados como la media de la EPP y su error estándar son alternativas valiosas para estimar la potencia de la vacuna con un valor estadístico más elevado que las otras pruebas de potencia, siempre que la relación entre los resultados

de la protección de los animales vacunados y los ensayos en sueros sean claramente establecidos.

## RESUMEN

Se hizo una comparación de la expectativa porcentual de protección, de acuerdo con los resultados de los estudios de anticuerpos séricos, utilizando las pruebas de neutralización, seroprotección y la protección frente al desafío. Se concluyó que las pruebas de anticuerpos con resultados expresados como la media de la expectativa porcentual de protección y su error estándar es una alternativa útil para estimar la potencia de la vacuna contra la fiebre aftosa.

## REFERENCIAS

1. CUNHA, R.G., BAPTISTA Jr., J.A., SERRÃO, U.M., TORTURELLA, I. El uso de los ratones lactantes en la evaluación de los anticuerpos contra el virus de la fiebre aftosa y su significación inmunológica. *Gac. Vet.*, B.Aires, 19 (110): 243-267, 1957.
2. GOMES, I., ASTUDILLO, V. Foot-and-mouth disease: evaluation of mouse protection test results in relation to cattle immunity. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa 17-18*: 9-16, 1975.
3. FERREIRA, M.E.V. Prueba de microneutralización para estudios de anticuerpos de la fiebre aftosa. (Microtiter neutralization test for the study of foot-and-mouth disease antibodies). *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa 21-22*: 17-20, 21-24, 1976.
4. STEEL, R.G.D., TORRIE, J.H. Principles and Procedures of Statistics. McGraw Hill, New York, 1960, p.433.
5. SUTMÖLLER, P., COSTA, K.de F., GOMES, I. Prueba de microneutralización por microtécnica para fiebre aftosa: cálculo de la expectativa porcentual de protección. (The serum microneutralization test for foot-and-mouth disease: establishment of an expected percentage of protection). *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa 39-40*: 31-36, 37-42, 1980.