

Inmunidad contra la fiebre aftosa evaluada a nivel nacional con posterioridad a la campaña de vacunación

National-level assessment of immunity against foot-and-mouth disease after the vaccination campaign

**Bernardo Cosentino¹, Jaquelina Bohl¹, Rodolfo Bottini¹,
Eduardo Maradei², Andrea Pedemonte², Fernando Mardones³,
Sergio Duffy⁴, Emilio León⁵ y Andrés Pérez^{3,4,6}**

¹Dirección Nacional de Sanidad Animal (SENASA), Argentina.

²Dirección de Laboratorios y Control Técnico (SENASA), Argentina.

³Center for Animal Disease Modeling and Surveillance, UC Davis, Estados Unidos

⁴Centro de Estudios Cuantitativos en Sanidad Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias UNR, Argentina.

⁵Instituto de Patobiología. CICVyA. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina.

Resumen

La Argentina es considerada por la Organización Mundial de la Salud Animal (OIE) como libre de fiebre aftosa (FA), y gran parte de su territorio se encuentra sometido a un programa de vacunación sistemática contra la enfermedad. El Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) evalúa la efectividad de las campañas de vacunación mediante el análisis de muestras séricas recolectadas a través de un muestreo estratificado al azar que se repite anualmente.

En este trabajo, se presentan los resultados de la evaluación de 32.151 muestras, procedentes de 2254 establecimientos, recolectadas en el período 2005-2009. Un test de ELISA en fase líquida para detección de proteínas estructurales contra las cepas A2001, O1 Campos y C3 Indaial fue utilizado para clasificar las muestras como pertenecientes a animales protegidos o sin protección, dependiendo del punto de corte de cada serotipo. Los predios con una probabilidad significativa ($p < 0,05$) de que al menos el 75 % de los animales estuvieran protegidos para al menos uno de los serotipos fueron considerados cubiertos por la campaña de vacunación. Para identificar factores asociados con ausencia de cobertura se utilizó un análisis de regresión multivariada.

El 92,3 % de los predios muestreados fueron clasificados como cubiertos. El único factor

Abstract

Argentina is considered foot-and-mouth disease (FMD) free by the World Organization for Animal Health (OIE), and most of its territory is under a systematic mass vaccination campaign. Annually, the Argentine National Animal Health and Agri-food Quality Service (Senasa) assesses the effectiveness of the mass vaccination campaign through the analysis of serum samples obtained using a stratified random design. Here, the results of 32,151 samples, collected from 2254 herds between 2005 and 2009 are reported. A liquid-phase ELISA test for detection of structural proteins against the A2001, O1 Campos, and C3 Indaial strains was used to classify the samples as belonging to protected or unprotected animals, depending on each serotype's cut-off value. Herds with a significant probability ($P < 0.05$) of having at least 75% of their animals protected against at least one of the serotypes were considered as covered by the vaccination campaign. A multivariate regression model was used to identify factors associated with absence of vaccine coverage at the herd level. The percentage of herds classified as covered was 92.3%. The only factor significantly ($P < 0.05$) associated with absence of vaccination was time since the latest vaccination, and those herds in which this time was longer than 180 days were 2.6 times (95%CI: 1.4-4.8) more likely to be

significativamente asociado con ausencia de cobertura vacunal ($p < 0,05$) fue el tiempo transcurrido desde la última vacunación, ya que aquellos establecimientos en los que dicho tiempo superó los 180 días tuvieron 2,6 veces (IC95%: 1,4 a 4,8) mayor probabilidad de ser clasificados como "no cubiertos" que aquellos en los que el tiempo fue menor a 120 días. En definitiva, los resultados demuestran que la cobertura vacunal alcanzada en las consecutivas campañas de inmunización en el país es consistente con el nivel de protección necesario para sustentar el estatus de libre de FA con vacunación del país.

Palabras clave: aftosa, epidemiología, vacunación, inmunidad, Argentina.

uncovered, compared to farms in which it was lower than 120 days. In conclusion, results show that the vaccine coverage reached over consecutive vaccination campaigns is consistent with the level of protection necessary to sustain the FMD-free with vaccination status of the country.

Key words: foot-and-mouth disease, epidemiology, vaccination, immunity, Argentina.

Introducción

La fiebre aftosa (FA) es considerada una de las enfermedades infecciosas de los animales de producción que mayor importancia reviste a nivel mundial, debido a las pérdidas económicas que ocasiona, relacionadas fundamentalmente con las restricciones asociadas al comercio internacional que sufren aquellos países que no se encuentran libres de ella de acuerdo con las condiciones establecidas por la Organización Mundial de la Salud Animal (OIE).

La Argentina es reconocida por la OIE como libre de FA, con dos zonas que aplican la vacunación (Cordón Fronterizo y Centro Norte) y dos zonas sin vacunación (Patagonia y Valles de Calingasta, San Juan). En las primeras se implementan campañas de vacunación masivas anuales o semestrales en función de la región y de la edad de los animales (Resolución SENASA N°385/2008 y sus modificatorias). La vacuna utilizada es de tipo oleosa y tetravalente (incluye las cepas A24/Cruzeiro, A/Argentina/2001, O1/Campos y C3 Indaial). La efectividad del programa de vacunación depende de numerosos factores (Doel, 1999; McVey and Shi, 2010):

- vacuna: potencia, seguridad, calidad, inmunidad conferida a las cepas circulantes
- animales: edad, estado inmunitario, tiempo entre vacunaciones
- operatividad de la vacunación: manejo, conservación, aplicación de la vacuna

El objetivo de toda campaña de vacunación es conferir inmunidad a un número suficiente de animales y de establecimientos como para prevenir la transmisión del virus de la FA (VFA) en caso de que este sea introducido en la población que se desea proteger. Por lo tanto, la evaluación de la efectividad de la campaña de vacunación es un componente crítico del plan de control y prevención de la enfermedad (Caporale *et al.*, 2012).

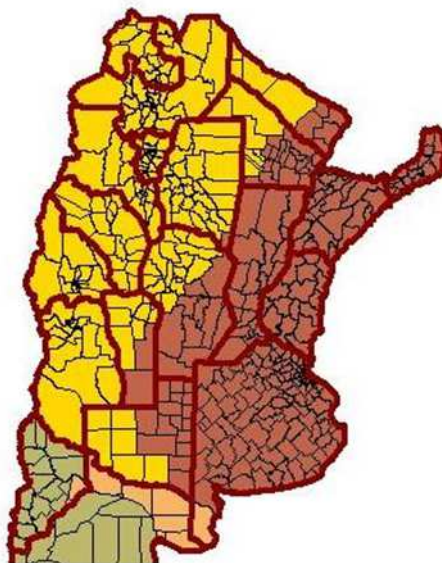
El objetivo de este trabajo es presentar la metodología utilizada por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) para evaluar la efectividad de las campañas de vacunación contra la fiebre aftosa en el territorio nacional. Se utilizan, a modo de ejemplo, los datos de monitoreo recolectados en el período 2005-2009.

Materiales y métodos

1. Fuente de datos

Anualmente se llevan a cabo dos muestreos a nivel nacional, cuyos objetivos son, respectivamente, 1) demostrar ausencia de circulación viral, buscando animales con anticuerpos contra las proteínas no estructurales del VFA; y 2) evaluar la efectividad de la campaña de vacunación, estimando los niveles de inmunidad poblacional. En el presente estudio, se utilizaron los datos correspondientes a este segundo muestreo. Las muestras se recolectaron utilizando un diseño estratificado, en el cual el territorio bajo vacunación se dividió en zonas, de acuerdo con el diseño establecido en cada año (Fig. 1, zonificación establecida en el muestreo del año 2009). Las zonas se definieron de acuerdo con las características productivas y geográficas, así como por funciones especiales, como zonas de frontera o de protección. El número de muestras fue calculado con el objetivo de estimar la proporción de bovinos y de establecimientos protegidos en cada zona, para tres categorías de animales: bovinos de 6 a 12 meses de edad (categoría 1), bovinos de 1 a 2 años (categoría 2) y bovinos mayores de 2 años (categoría 3). Además, se recolectaron otras muestras, utilizando un diseño dirigido al riesgo, para evaluar inmunidad en algunos grupos específicos, por ejemplo, terneros movilizados de zona de cría a *feed-lots* y muestreos complementarios en la zona de alta vigilancia epidemiológica, localizada en la frontera norte del país. En el presente trabajo se analizaron 32.151 muestras, procedentes de 2.254 establecimientos, obtenidas durante los muestreos realizados entre los años 2005 y 2009.

Figura 1: Estrategia de zonificación utilizada para el diseño del muestreo para determinar efectividad y cobertura vacunal para fiebre aftosa en el año 2009



Las muestras de suero fueron procesadas mediante un test de ELISA en fase líquida para detección de proteínas estructurales contra las cepas A2001, O1 Campos y C3 Indaial (Robiolo et al, 2010).

2. Análisis de datos

Se utilizaron puntos de corte (PC) específicos para definir cada muestra como correspondiente a un animal “protegido” o “no protegido”, en función del resultado serológico. Los PC para cada serotipo fueron provistos por el laboratorio:

Serotipo A: 2,20

Serotipo O: 2,11

Serotipo C: 2,16

Previamente al análisis de los muestreos, los valores de sensibilidad (Se) y especificidad (Es) asociados con estos PC se determinaron a partir de una tabla de contingencia 2 x 2. Para ello, cada animal fue clasificado en función de los resultados obtenidos en: 1) la prueba de generalización podal (PGP: método de referencia utilizado en las pruebas de potencia de vacuna); y 2) la prueba de ELISA en fase líquida. Según el resultado de la PGP un animal fue clasificado como “enfermo” si resultó positivo a la PGP (PGP+) o como “no enfermo” si fue negativo (PGP-). Según el resultado de ELISA fue clasificado como “protegido” o “no protegido” si superó o no el PC especificado anteriormente para cada uno de los tres serotipos de virus. La Se y la Es del ELISA para determinar protección se estimaron, para cada serotipo, como la

proporción de animales “enfermos” (Se) y “sanos” (Es) correctamente identificados por el ELISA para el PC correspondiente.

Con el fin de determinar la efectividad de la vacunación para cada serotipo, se estimó la probabilidad de que un establecimiento estuviese “protegido” a un 95 % de confianza, definiendo como “protegido” al establecimiento en el cual al menos el 75 % de los animales resultaron protegidos, de acuerdo con el PC anteriormente descrito. Para esto se tomó en cuenta el número de bovinos presentes en el establecimiento, el número de muestras tomadas y los resultados de ELISA obtenidos. A partir de la Se y la Es obtenidas para cada serotipo, se determinó la probabilidad de que el establecimiento estuviera o no cubierto para un determinado serotipo o en general (Cameron and Baldock, 1998). Se consideró “cubierto” al establecimiento “protegido” para al menos uno de los tres serotipos, debido a que el objetivo del análisis es determinar la efectividad de la última campaña de vacunación, y se asume que no es posible obtener tal nivel de protección en cualquier serotipo en ausencia de vacunación. Los análisis se llevaron a cabo utilizando la herramienta FreeCalc incluida en el programa Survey Toolbox.

Los establecimientos fueron clasificados como “cubiertos” o “no cubiertos”. En ciertos establecimientos el procedimiento no permitió definir cobertura, y fueron clasificados como “inconclusos”. Esta situación ocurrió cuando el número de muestras no fue suficiente.

Una vez clasificados los establecimientos (“no cubierto”, “cubierto”, “inconcluso”), se procedió a llevar a cabo una serie de análisis estadísticos que incluyeron regresión logística bivariada y multivariada, y análisis para identificación de agrupamientos espacio-temporales. El objetivo fue detectar asociaciones entre factores con potencial para afectar la cobertura vacunal y el estatus de los establecimientos. Los factores incluidos en el estudio fueron: año de toma de muestra (2005, 2006, 2007, 2008, 2009), número de animales en el establecimiento (<250, 250-1000, 1000-2000, >2000), tiempo transcurrido desde toma de muestra y la vacunación precedente (30-120, 120-180, >180 días), tiempo transcurrido entre la vacunación precedente a la toma de muestras y la anterior (60-180, 180-240, >240 días) y tipo de producción (cría/recría, engorde, tambo, subsistencia, inespecífico).

Los establecimientos “cubiertos” e “inconclusos” fueron agrupados y constituyeron el grupo control. Solo aquellos que aparecen como no cubiertos para los tres serotipos fueron denominados como casos (criterio conservador). Inicialmente, la asociación de cada una de las variables consideradas como potenciales factores de riesgo fue estimada en relación con el estatus de la explotación (“caso”, “control”) en forma bivariada. Aquellas variables significativas con un valor de $p < 0,15$ fueron incluidas en un modelo de regresión logística multivariada. El modelo fue ajustado utilizando un proceso o método por pasos regresivos (*stepwise backward process*) en el programa STATA.

Resultados

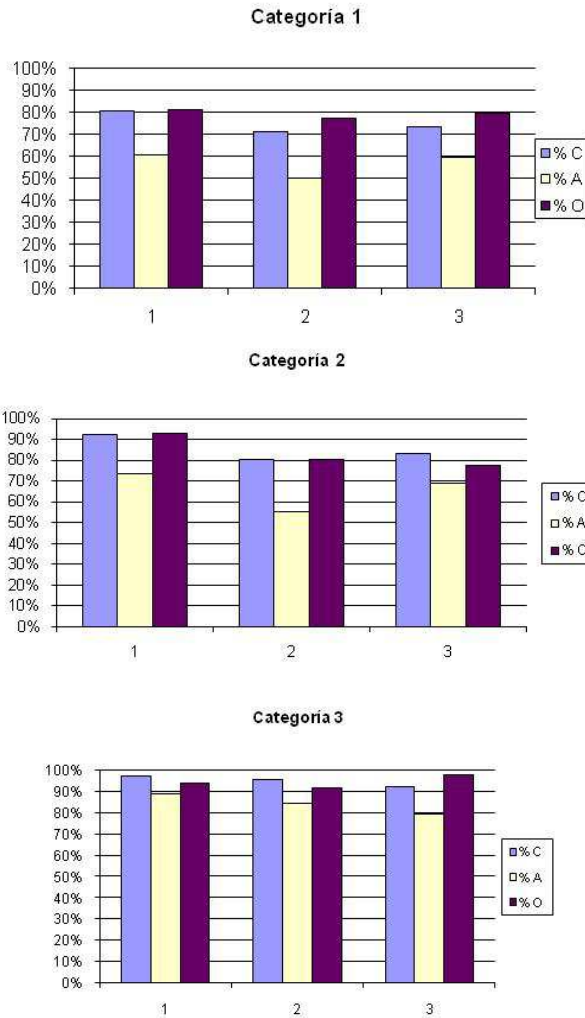
La Se del ELISA para determinar protección osciló entre 65 y 74 %, mientras que su Es varió entre 64 y 82 %, dependiendo del serotipo analizado (Tabla 1). A modo de ejemplo, para la interpretación de estos resultados se explicarán los correspondientes al serotipo O. En la tabla se muestran los resultados de la PGP: 78 "enfermos" (PGP +) y 180 "no enfermos" (PGP-). De acuerdo con el punto de corte (PC) de 2,11 [Según Resolución SENASA N.º 111/2010, para una Expectativa Porcentual de Protección (EPP) del 75 %], de los 78 PGP+, 64 superaron el PC (ELISA+) y 14, no (ELISA-), mientras que de los 180 PGP-, 63 y 117 resultaron ELISA- y ELISA+, respectivamente. Estas cifras permiten obtener valores de Se y Es de 65 % y 82 % respectivamente.

Tabla 1: Sensibilidad (Se) y Especificidad (Es) del ELISA para determinar protección vacunal a campo en la Argentina

	Serotipo A			Serotipo O			Serotipo C		
	PGP-	PGP+	Total	PGP-	PGP+	Total	PGP-	PGP+	Total
ELISA +	90	9	99	117	14	131	75	8	83
ELISA -	31	16	47	63	64	127	16	19	35
Total	121	25	146	180	78	258	91	27	118

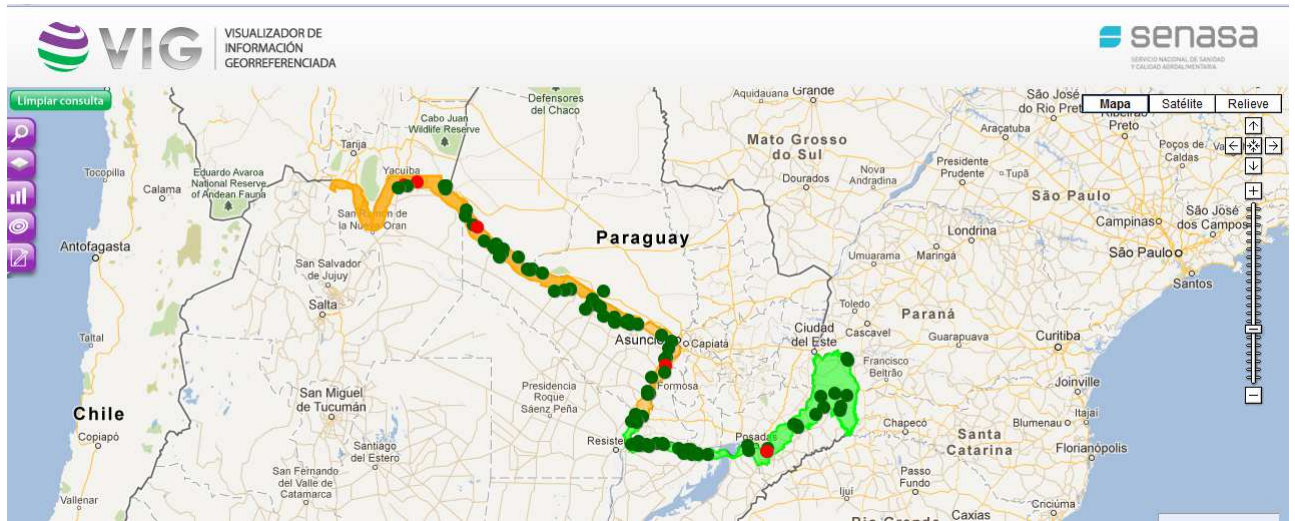
Características prueba ELISA	Serotipo A	Serotipo O	Serotipo C
Sensibilidad (Se)	74,4	65,0	82,4
Especificidad (Es)	64,0	82,1	70,4
Tasa de Falsos Positivos	36,0	18,0	29,6
Tasa de Falsos Negativos	25,6	35,0	17,6

En la Figura 2, que se presenta a continuación, se observa la distribución de resultados correspondientes a animales para el año 2009, discriminado por categoría y por tipo de virus, para las tres zonas analizadas.



La proporción de establecimientos cubiertos para cada serotipo fue el 80 % para el A, el 94 % para el O y el 67 % para el C. Asumiendo que niveles de inmunidad compatibles con vacunación para al menos uno de los serotipos indica vacunación, el porcentaje de predios en los que la esta resultó efectiva fue del 92,3 %, y el 7,8 % restante correspondió a aquellas explotaciones con el más estricto criterio de categorización, es decir, no cubiertos para ninguno de los tres serotipos, por lo que no es posible concluir que hay evidencia suficiente de que hayan sido correctamente vacunados durante la última campaña.

La figura 3, que se presenta continuación, indica la localización de establecimientos cubiertos y sin cobertura en la zona del Cordón Fronterizo.



Del análisis bivariado, tres variables aparecen estadísticamente asociadas con los establecimientos no cubiertos: número de animales en el establecimiento (a menor número de animales, mayor probabilidad de estar no cubierto), tiempo transcurrido desde la vacunación precedente hasta la toma de muestra (a mayor tiempo, mayor probabilidad de estar no cubierto) y tipo de producción (los establecimientos de subsistencia mostraron mayor probabilidad de estar no cubiertos). Sin embargo, del análisis multivariado se concluye que el tiempo entre la toma de muestra y la vacunación precedente es la única variable significativamente asociada con la ausencia de cobertura ($p < 0,05$). Los establecimientos en los que dicho tiempo superó los 180 días tendrían una probabilidad 2,6 veces mayor (IC95 %: 1,4 a 4,8) de ser clasificados como “no cubiertos” que aquellos en los que el tiempo fue menor a 120 días.

Discusión y conclusiones

El objetivo de este trabajo fue evaluar la inmunidad poblacional como indicador de cobertura vacunal, e identificar factores relacionados con la ausencia de cobertura utilizando datos retrospectivos de los muestreos nacionales obtenidos entre los años 2005 y 2009. Los resultados sugieren una excelente cobertura vacunal, dado que más de 90 % de los establecimientos muestreados demostraron evidencia de inmunidad asociada con vacunación para al menos uno de los tres serotipos. El criterio de considerar como cubierto a aquel predio que demuestre protección para al menos uno de los tres serotipos se debió a que tal nivel de inmunidad puede ser alcanzado solamente en asociación a la aplicación de la vacuna. Por lo tanto, el objetivo de la evaluación, referido a estimar la proporción de predios en los que efectivamente se vacunó, es consistente con este criterio.

En términos generales, el ELISA utilizado para determinar protección vacunal demostró una excelente Es y una buena Se. Este resultado es compatible con conocimientos previos

referidos a la dinámica inmunológica de la enfermedad. Animales con niveles de anticuerpo relativamente altos estarán protegidos, pero otros con niveles de anticuerpo relativamente bajos (por lo tanto, detectados como no protegidos por el ELISA) también pueden estarlo. De esta manera, el uso del ELISA para determinar protección determina una Es relativamente alta (baja probabilidad de falsos positivos) y una Se relativamente menor (mayor probabilidad de falsos negativos). Nótese que esta baja Se resulta en que, en realidad, es probable que la inmunidad real a campo sea mayor que la estimada como resultado del análisis.

El único factor relacionado con ausencia de cobertura vacunal fue el tiempo entre vacunación y toma de la muestra.

Este hallazgo sugiere que una buena parte de las explotaciones determinadas como no cubiertas podría corresponder, en realidad, a explotaciones en las que el tiempo desde la última vacunación fue suficientemente largo como para resultar en una disminución de los títulos de anticuerpos por debajo del punto de corte. Debido a que la toma de muestra para evaluar protección vacunal se lleva a cabo en el momento en que los animales son revacunados, es probable que esta esté reflejando el menor nivel de inmunidad poblacional esperada y no la inmunidad promedio entre dos campañas de vacunación.

Las tres zonas estudiadas fueron relativamente homogéneas en la proporción de animales protegidos, con animales mayores de un año demostrando un buen nivel de protección en las tres zonas (Figura 2).

En definitiva, los resultados demuestran que la cobertura vacunal alcanzada en las consecutivas campañas de vacunación en el país ha sido superior al 90 %, resultado consistente con el nivel de protección necesario para sustentar el estatus de libre de FA con vacunación del país.

Bibliografía

- Cameron, A. R. y F. C. Baldock (1998), "A new probability formula for surveys to substantiate freedom from disease", *Preventive Veterinary Medicine*, 34 (1), pp. 1-17.
- Caporale, V.; Giovannini, A. y C. Zepeda (2012), "Surveillance strategies for foot and mouth disease to prove absence of disease and absence of viral circulation", *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 31 (3), pp. 747-759.
- Doel T. R. (1999), "Optimisation of the immune response to foot-and-mouth disease vaccines", *Vaccine*, 17, pp. 1767-1771.
- McVey S. y J. Shi (2010), "Vaccination strategies for emerging diseases epidemics of livestock!", *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 26, pp. 173-183.
- Robiolo, B.; La Torre, J.; Duffy, S.; León, E.; Seki, C.; Torres, A. y N. Mattion (2010), "Quantitative single serum-dilution liquid phase competitive blocking ELISA for the

assessment of herd immunity and expected protection against foot-and-mouth disease virus in vaccinated cattle”, *Journal of Virological Methods*, 166, pp. 21-27.

Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (2008), Resolución N.º 385 y sus modificatorias.