

ANEXO II

VALIDACIÓN ESTADÍSTICA
MODELO COBAYO INTA
POTENCIA DE VACUNAS PARA
EL VIRUS DE PARAINFLUENZA-3 BOVINO



Lista de abreviaturas

PI-3: virus parainfluenza tipo 3 bovino

Mín-Máx: Valores mínimo y máximo, respectivamente.

SD: Desvío estándar.

LCI: Límite de confianza inferior bilateral al 95 %.

LCS: Límite de confianza superior bilateral al 95 %.

Título de Ac. : Título de Anticuerpos transformados a logaritmos

IHA: Inhibición de hemoaglutinación

UIHA: unidades inhibitorias de la hemoaglutinación

ANOVA: Análisis de varianza

Ag: Antígeno

dpv: días post vacunación

EL ESTUDIO

- Objetivos**
- 1. Ensayo dosis respuesta de vacunas contra Parainfluenza 3 bovino (PI-3)**
 - Capacidad discriminadora del modelo cobayo y la especie de destino (bovinos) para diferenciar vacunas oleosas formuladas con concentraciones crecientes de Ag de PI-3.
 - Estimar el tiempo óptimo de muestreo en bovinos y cobayos para realizar la comparación de parámetros serológicos entre el modelo y la especie de destino.
 - 2. Establecer un criterio de clasificación de vacunas comerciales en el modelo cobayo y los bovinos.**
 - 3. Análisis de Concordancia entre el bovino y el modelo cobayo para clasificar vacunas gold std de concentración conocida y vacunas comerciales, según los puntos de corte establecidos.**

1. Diseño Estudio experimental. La selección aleatoria de los animales ensayados estuvo a cargo del grupo de investigación.

2. Variables en estudio Se evaluó el título de Ac por IHA para PI-3, a los 0, 30, 60 y 90 días dpv en bovinos y a los 0, 30 y 60 dpv en cobayos.

2. Grupo de Investigación Laboratorio VD, Instituto de Virología, CICV y A, INTA

3. Período. Los datos provienen de ensayos realizados durante 2004 – 2005- 2006 en el marco del CVT 1664 INTA-Biogénesis Bagó.
Análisis estadístico basado en un informe previo realizado en 2006.
Fecha de informe: Septiembre 2012.

5. Número de animales **Dosis respuesta:** 80 bovinos mayores de seis meses de edad y 90 cobayos de 450 a 550 gr de peso en grupos de 5.

Concordancia: 500 bovinos y 428 cobayos en grupos de 5 a 10, correspondientes a 74 vacunas comerciales y experimentales.

Diseño Experimental, materiales y métodos

Vacunas:

Se formularon dos sets vacunas oleosas, polivalentes conteniendo las valencias virales IBR, BVDV y dosis crecientes de antígeno de virus PI-3 bovino cepa de referencia SF4 (genotipo A). El rango de concentración viral utilizada en cada vacuna, varió en 1 o medio log₁₀ de diferencia entre cada vacuna. Cada set de 4 vacunas cada uno se evaluó en paralelo en bovinos y cobayos, en dos experimentos independientes según se detalla en la tabla 1.

Tabla 1. Experimentos dosis respuesta en Bovinos y cobayos

Set de vacunas	Set 1	Set 2
Ensayo a campo bovinos/	1.1 – 1.2	2.1 -2.2
Ensayo en cobayos		
año	2004	2005
PI-3	A Oleosa (10 ⁸)	C Oleosa (10 ⁷)*
Vacunas: concentración del	B Oleosa (5x10 ⁷)	C Oleosa (10 ⁷)*
antígeno expresada en	C Oleosa (10 ⁷)	D Oleosa (10 ⁶)
DICT50/dosis	D Oleosa (10 ⁶)	E Oleosa (10 ⁵)
	Placebo/testigos	Placebo/testigos

*En el año 2005, set de vacunas 2, se probaron dos vacunas con 10⁷ DICT₅₀/dosis de PI-3

Bovinos:

Es importante destacar que la infección por el virus de parainfluenza tipo 3 bovino es endémica en el ganado bovino a nivel mundial (Ellis, 2010) y que todos los terneros reciben anticuerpos calostrales anti-PI-3 que pueden persistir hasta los 6 meses de edad. Se estima que cuando los títulos de Ac calostrales disminuyen a valores inferiores a 1/32 (256 UIHA) los terneros se encuentran altamente susceptibles a sufrir la infección por PI-3, que pueden ser sintomática o no y rápidamente desarrollan anticuerpos frente al agente.

En función de lo expuesto, para realizar el ensayo dosis-respuesta propuesto se utilizaron terneros de cría de las razas angus, heresford y sus cruizas, mayores de 6 meses de edad. Las experiencias se realizaron en las temporadas 2004 y 2005, (set 1.1: Exp 301.04-1, grupos de 5 animales, un evento; set 1.2: Exp 301.04-bis, grupos de 5 animales, un evento; set 2.1 y 2.2: Exp 546-05, 2 grupos de 5 animales para cada grupo, en dos eventos independientes;). En todos los casos se determinó el título de Ac basales contra PI-3 por IHA para armar los grupos con medias de Ac basales homogéneas. Los animales incluidos en el ensayo debían ser primo-vacunados con las vacunas bajo estudio. Los animales fueron vacunados con dos dosis de 3 ml de vacuna con un intervalo de 30 días y se tomo muestras de suero a los 0, 30, 60 y 90 días post vacunación (dpv) (Figura 1a). Se incluyó un grupo placebo y un grupo de animales no vacunados como testigos. El estudio completo involucró 80 bovinos de cría (Parreño, 2010; Parreño, 2008).

Cobayos

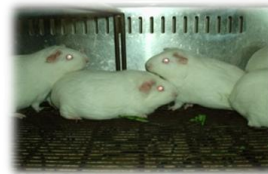
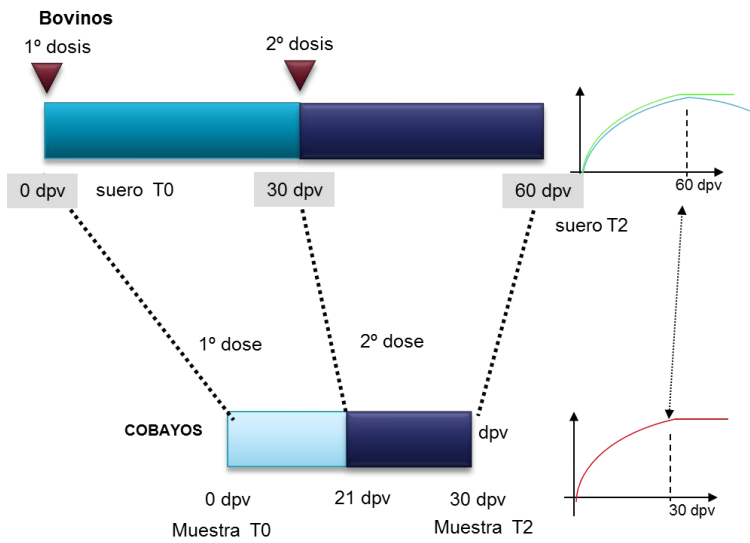
Por su parte, los cobayos de 400-500 gramos de peso fueron controlados para determinar que fueran seronegativos para Ac IHA contra PI-3 y luego fueron vacunados con dos dosis de vacuna de un volumen de dosis correspondiente a 1/5 de la dosis bovina, por vía parenteral, con un intervalo de 21 días, los animales se muestrearon a los 0, 30 y 60 dpv (Figura 1a y b). El estudio completo involucró 90 cobayos (Exp 500.2-05; 500.3-05; 255.1-04; 255.2-04) (Parreño, 2010; Parreño, 2008).

Análisis de muestras:

La respuesta inmune humoral frente a la vacunación con PI-3 se evaluó en el sueros de los animales vacunados mediante la técnica de inhibición de la hemoaglutinación de GR de cobayos según la metodología que se detalla en el Anexo I de la guía del modelo para PI-3.

Figura 1.a

PROTOCOLO DE INMUNIZACIÓN



NÚMERO MÍNIMO DE ANIMALES POR GRUPO n=5 (85% Cobertura)

Figura 1.b

Desarrollo y Validación Modelo Cobayo

CONDICIONES ESTABLECIDAS PARA REALIZAR LAS PRUEBAS

- **Volumen de dosis:** 1/5 dosis bovina $\left\{ \begin{array}{l} 5 \text{ ml} \rightarrow 1.0 \text{ ml} \\ 3 \text{ ml} \rightarrow 0.6 \text{ ml} \end{array} \right.$
- **Cantidad de dosis:** 2
- **Intervalo entre dosis:** 21 días
- **Vía:** Parenteral (SC)
- **Toma de muestras:** 0 – 30 dpv



Análisis de datos:

Con los resultados obtenidos se construyó una base de datos del **ensayo dosis-respuesta**. Todos los ensayos realizados en cobayos y bovinos generaron resultados procesables. De esta manera se obtuvieron 17 valores promedio de título de anticuerpos IHA para cada especie, correspondiente a grupos conformados por 5 cobayos y 5 bovinos, vacunados con las vacunas calibradoras formuladas con concentraciones crecientes de PI-3 que permitieron hacer el estudio de la cinética y magnitud de la respuesta de anticuerpos en cada especie, la capacidad discriminante del bovino y el modelo cobayo de diferenciar entre vacunas de diferente concentración antigénica de PI-3 (Akkermans and Hendriksen, 1999; Davies, 1966; Pryseley et al., 1999).

Vacunas probadas para evaluar la concordancia entre el modelo y la especie destino:

Para estudiar el grado de concordancia entre el modelo cobayo y los bovinos se analizaron un total de 71 casos que incluyeron las 17 vacunas oleosas calibradoras, elaboradas para realizar el ensayo dosis-respuesta, 16 grupos controles negativos que recibieron placebos o no fueron vacunados (testigos), 6 vacunas experimentales de potencia conocida (gold estándar), de las cuales una fue oleosa y cinco acuosas. Finalmente se incluyeron 32 vacunas comerciales, 18 acuosas y 14 oleosas (apéndice I, vacunas análisis de concordancia).

Métodos Estadísticos:

El análisis estadístico abordó básicamente la comparación de promedios del título de Ac. de distintos tiempos de muestreo en vacunas experimentales. Los datos de títulos de Ac IHA en cobayos y bovinos determinados a los 0, 30 y 60/90 dpv, respectivamente, fueron analizados mediante un modelo mixto de medidas repetidas (Littell et al., 1998). Las diferencias entre medias se probaron empleando el criterio de Bonferroni. Se empleó el criterio de Akaike para la selección de la matriz de covarianzas. En los casos en que la interacción Vacuna*Momento resultó significativa la comparación de medias se efectuó dentro de cada momento (Di Rienzo, 2002; Littell et al., 1998; Westfall et al., 1999).

Para determinar los puntos de corte de clasificación de vacunas en ambas especies se empleó análisis de regresión. Brevemente para los títulos de Ac IHA anti-PI-3 inducido por las 17 vacunas calibradoras utilizadas en los ensayos dosis respuesta en cada especie (Cobayo y Bovino), se estimó el modelo lineal polinómico (de segundo grado), que mejor ajustara los datos. Para cada caso se informan los coeficientes de cada modelo ajustado, la significación del modelo, el coeficiente de determinación (r^2), los títulos estimados para las concentraciones de interés (10^5 y 10^7 DICT₅₀/dosis) y la estimación de los Límites Inferiores de los Intervalos de Predicción (LIP) para el título de Ac. esperado para dichas concentraciones. En cada caso se adjuntan también los gráficos de las curvas estimadas, con las correspondientes bandas de confianza y de predicción.

Finalmente, para establecer el grado de concordancia entre el modelo cobayo INTA y bovino para clasificar vacunas de PI-3, según los puntos de corte establecidos, se analizaron las vacunas detalladas en el Apéndice 1 mediante el índice Kappa ponderado. Para cada especie (Bovino y Cobayo), se efectuó un análisis descriptivo, para evaluar promedios, medianas y medidas de variación, a través de las categorías propuestas. Se incluyen los Box & Whisker para visualizar el nivel de discriminación entre categorías. A partir de la aplicación simultánea del criterio de categorización en Bovinos y Cobayos, se generaron tablas de contingencia, para evaluar la concordancia entre ambos criterios. El nivel de concordancia fue evaluado mediante el índice KAPPA ponderado, acompañado de su SE asintótico y el intervalo de confianza del 95 % (Altman, 1997). En primer lugar, dicho índice fue estimado para el conjunto de vacunas de concentraciones conocida cuya información puede considerarse un Gold Standard, en este caso se evaluó la posible discrepancia con las predicciones efectuadas por cada modelo por separado. Luego se comparó la concordancia entre el modelo y la especie de destino y luego se completó en análisis incluyendo las vacunas comerciales. Valores de índice Kappa ponderado entre 0.41-0.60 indica concordancia moderada, valores de 0.61 a 0.80 indican concordancia sustancial o aceptable, mientras que valores mayores a 0.80 se considera concordancia casi perfecta (Viera and Garrett, 2005).

RESULTADOS

1-Ensayo Dosis respuesta Bovinos

- Evaluación de la inmunogenicidad y cinética de respuesta de anticuerpos IHA anti-PI-3 en bovinos vacunados**

Inicialmente se realizó un ensayo dosis respuesta que abarcó vacunas de concentración de Ag de PI-3 de 10^8 a 10^6 DICT₅₀/dosis de PI-3. En este primer ensayo se evaluaron vacunas que diferían entre 1 y $\frac{1}{2}$ logaritmo en su concentración antigénica. Todos los grupos de bovinos iniciaron la prueba con títulos basales de Ac contra PI-3 estadísticamente similares. El análisis de la cinética de respuesta de Ac IHA anti PI-3 en los bovinos vacunados con este 1º set de vacunas, probado en dos ensayos de campo en dos rodeos diferentes, indicó que las vacunas así formuladas fueron muy inmunogénicas. Los grupos vacunados seroconvirtieron para Ac IHA anti-PI-3 luego de una dosis a los 30 dpv y alcanzaron un título de Ac plateau que se mantuvo hasta los 90 dpv, diferenciándose estadísticamente del grupo control no vacunado o vacunado con placebo (Tabla 2; Figura 2).

Los bovinos no lograron discriminar entre vacunas que diferían en $\frac{1}{2}$ o 1 log en su concentración antigénica en el rango de virus utilizado (Tabla 2), por lo que se decidió realizar un segundo experimento con una concentración menor de antígeno.

Tabla 2. Set 1.1 + 1.2 (Exp 301-04/301bis-04).

Vacuna	n	Momento de sangrado (días)			
		0	30	60	90
A Oleosa 10^8	10	2.41 A	3.32 A*	3.38 A*	3.26 A*
B Oleosa 5×10^7	10	2.41 A	3.41 A*	3.41 A*	3.43 A*
C Oleosa 10^7	10	2.51 A	3.23 A*	3.26 A*	3.28 A*
D Oleosa 10^6	10	2.51 A	3.10 A*	2.98 A	3.26 A*
Testigos/Placebo	10	2.19 A	2.29 B	2.23 B	2.23 B

Nota: Los valores están expresados como medias aritméticas de los títulos de Ac.

Medias en una misma columna con diferente letra difieren significativamente.

Medias en la misma fila con asterisco indican diferencia significativa (seroconversión respecto del nivel de Ac basales).

La interacción Vacuna*Momento fue significativa ($p < 0.0001$)

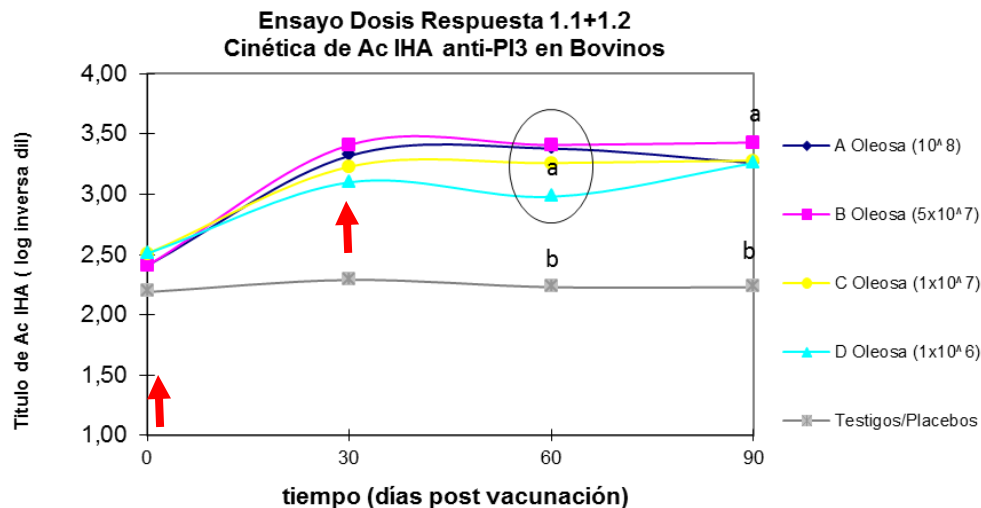


Figura 2. Cinética de respuesta de Ac anti-PI-3 en bovinos vacunados con vacunas oleosas con dosis crecientes de Ag. Dosis Rta set 1.1+1.2

En el segundo experimentos se preparó un nuevo set de vacunas que fue aplicada a dos grupos de bovinos, en dos ensayos independientes, en el mismo rodeo. En este caso, se prepararon dos vacunas con 10^7 , una vacuna con 10^6 y otra con 10^5 DICT₅₀ de PI-3/dosis. Nuevamente los bovinos iniciaron la experiencia con títulos de Ac basales estadísticamente similares y seroconvirtieron para Ac IHA anti-PI-3 luego de una dosis (vacunas 10^7 y 10^6), alcanzando un plateau que se mantuvo hasta los 90 dpv. OPor su parte, la vacuna formulada con 10^5 de PI-3/dosis elevó levemente el titulo de Ac luego de 1 y 2 dosis de vacuna pero a niveles que no se consideran seroconversión. A los 60 días post vacunación los títulos de Ac promedio inducidos por la vacuna con concentración de Ag de 10^5 fue significativamente inferior a los de las vacunas con concentraciones superiores y a los 90 dpv los bovinos vacunados con esta vacuna retornaron su nivel basal de Ac contra PI-3.

Tal lo observado en el experimento anterior, a los 60 dpv, los bovinos no fueron capaces de discriminar entre vacunas que poseen 10^6 y 10^7 DICT₅₀ de Ag de PI-3, pero si diferenciaron entre estas dosis y vacunas conteniendo 10^5 .

La capacidad de discriminar significativamente entre vacunadas que difieren en 1 log10 recién se logra a los 90 días. Este segundo experimento permitió determinar que vacunas con concentraciones de Ag de 10^5 ya no serian inmunogénicas para indicar niveles de Ac detectables por la técnica de IHA (representando el limite de detección de la técnica) (Tabla 3; Figura 3).

Tabla 3. Set 2.1 + 2.2 (Exp 546-05)

Vacuna	n	Anticuerpos IHA anti-PI3 Tiempo (dpv)			
		0	30	60	90
C Oleosa 10^7	10	1.87 A	3.23 A*	3.23 A*	3.14 AB*
C Oleosa 10^7	10	1.99 A	3.31 A*	3.38 A*	3.28 A*
D Oleosa 10^6	10	1.93 A	3.11 A*	3.28 A*	2.81 B
E Oleosa 10^5	10	2.02 A	2.37 B	2.54 B	2.09 C
Placebo	10	1.87 A	2.02 B	1.98 C	1.87 C

Nota: Los valores están expresados como medias aritméticas de los títulos de Ac.

Medias en una misma columna con diferente letra difieren significativamente.

Medias en una misma fila con asterisco difieren significativamente del titulode Ac basal (seroconversión)

La interacción Vacuna*Momento fue significativa ($p < 0.0001$)

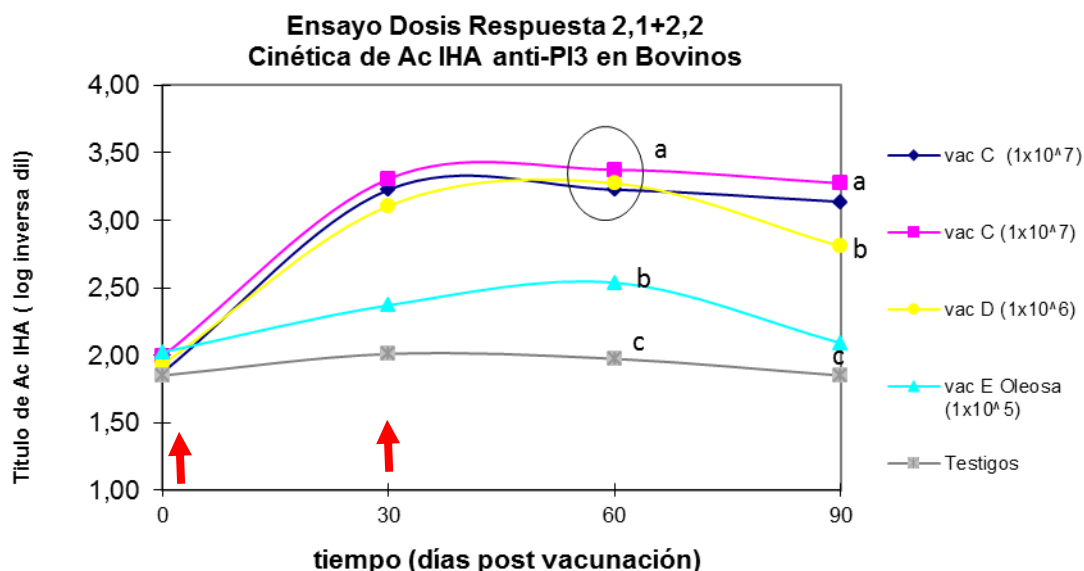


Figura 3. Cinética de la Respuesta de Ac IHA anti-PI-3 en Bovinos (Ensayo Dosis Respuesta Set 2 ensayos 2.1 + 2.2)

Ensayo dosis respuesta en cobayos:

Estudio de la inmunogenicidad, cinética de respuesta de Ac y capacidad discriminante del modelo cobayo como prueba alternativa de potencia de vacunas de PI-3

En la tabla 4 se detalla en análisis estadístico del total de grupos de cobayos inmunizados con cada vacuna, agrupadas por dosis de Ag. Los cobayos iniciaron la experiencia seronegativos para Ac IHA contra PI-3. Luego de dos dosis de vacunas (0 y 21 ds), todos los cobayos de los grupos vacunados con vacunas conteniendo 10^8 , 5×10^7 ; 10^7 y 10^6 DICT₅₀ de PI-3/dosis seroconvierten a los 30 dpv. Las vacunas que contiene 10^7 de virus o más presentan títulos significativamente mayores a los 30 dpv que las vacunas formuladas con 10^6 , que a su vez se diferencian de las vacunas 10^5 de virus, que prácticamente no inducen respuesta detectable por IHA. Sólo se detecta un aumento significativo del título de Ac. promedio al día 60 en la vacuna con concentración 10^6 . En esta vacuna, la diferencia media verdadera apenas supera, como máximo, medio logaritmo. La vacuna con 10^5 de virus, al igual que lo observado en bovinos, no logra generar seroconversión biológicamente relevante en los 4 lotes de cobayos vacunados (Tabla 4, Figura 4).

Del resultado obtenido en estos ensayos en cobayos, se concluye que la administración de dos dosis de vacuna con un intervalo de 21 ds entre dosis permite obtener una cinética y magnitud de respuesta de Ac anti PI-3 similar a la observada en los bovinos. Asimismo, el cobayo, probablemente por su condición de seronegativo, posee mayor poder discriminante que el bovino para evaluar la inmunogenicidad de vacunas para PI-3 siendo los 30 dpv el momento óptimo de toma de muestra para realizar la evaluación. El modelo cobayo, al igual que los bovinos, no seroconvierte para Ac IHA al recibir vacunas con 10^5 de Ag de PI-3 (límite de detección).

**Tabla 4. Ensayo dosis respuesta Cobayos:
(Set 2.1 + 2.2 + Set 1.1 + 1.2)**

Vacuna	n	Momento de sangrado (días)			SD*
		0	30	60	
A Oleosa 10^8	25	1.00	3.15 A	3.07 A	0.34
B Oleosa 5×10^7	9	1.00	3.28 A	3.08 A	0.30
C Oleosa 10^7	30	1.00	2.97 A	3.08 A	0.31
D Oleosa 10^6	19	1.00	2.00 B	2.77 A	0.71
E Oleosa 10^5	10	1.00	1.00 C	1.45 B	0.68

* Desvío estándar de la diferencia.

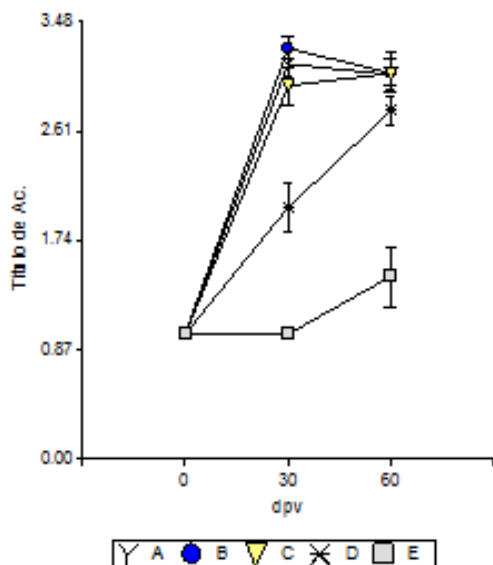


Figura 4. Título de Ac. promedio y Error Estándar de vacunas oleosas con distinta concentración antigénica. IHA para PI-3 en cobayos

Ensayos Dosis Respuesta: Capacidad Discriminatoria Vacunas Oleosas Cobayos PI-3 IHA

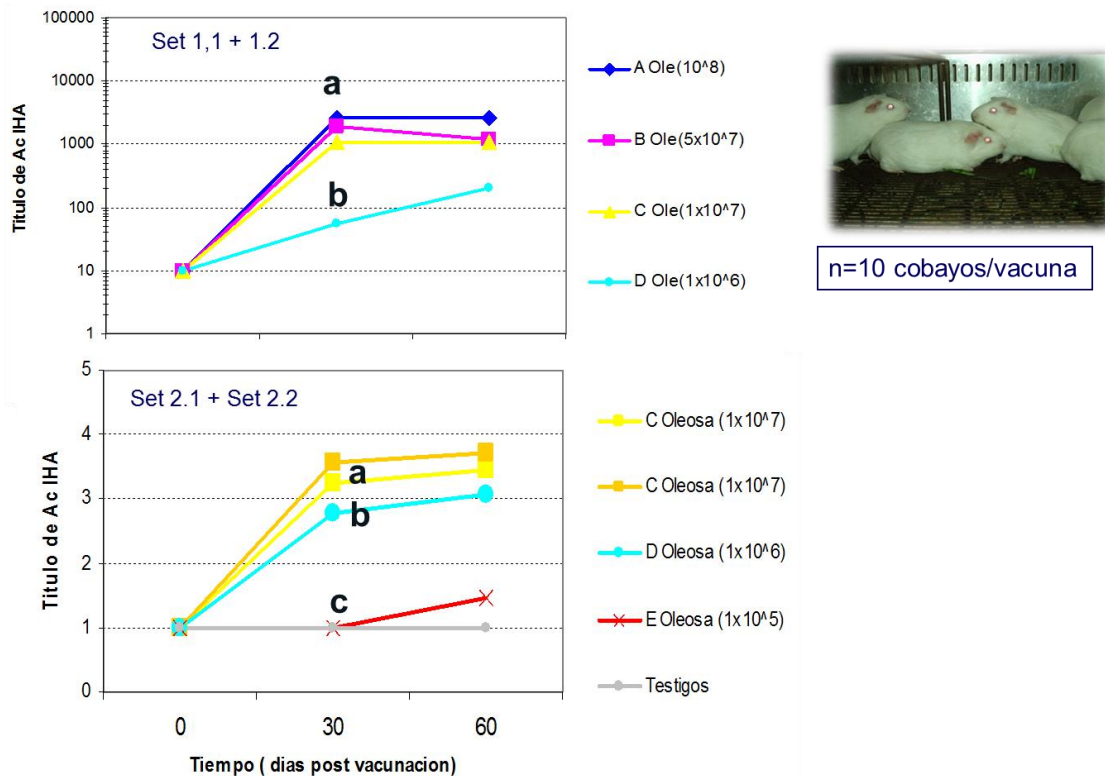


Figura 5. Cinética de respuesta de Ac anti-PI-3 y estudio de la capacidad discriminante del modelo cobayo para distinguir entre vacunas con concentración viral creciente. (cada set de vacunas elaborado en dos años consecutivos, probados en dos lotes de cobayos de 5 animales cada uno).

Tabla 5. Experimento 1.1 + 1.2 PI-3 IHA

Vacuna	Momento de toma de muestra (dpv)		
	0	30	60
C Oleosa 10^7	1.00	3.26 A	3.45 A
C Oleosa 10^7	1.00	3.56 A	3.71 A
D Oleosa 10^6	1.00	2.77 B	3.06 B
E Oleosa 10^5	1.00	1.00 C	1.45 C
Placebo/ testigos	1.00	1.00	1.00

Nota: Los valores están expresados como medias aritméticas de los títulos de Ac. Medias en una misma columna con diferente letra difieren significativamente. La interacción Vacuna*Momento no fue significativa ($p=0.475$).

Tabla 6. Experimento 2.1 + 2.2 - PI-3 IHA

Vacuna	Momento de toma de muestra (dpv)		
	0	30	60
C Oleosa 10 ⁷	1.00	3.47 A	3.63 A
C Oleosa 10 ⁷	1.00	3.65 A	3.77 A
D Oleosa 10 ⁶	1.00	2.88 B	3.10 B
E Oleosa 10 ⁵	1.00	1.00 C	1.38 C
Placebo/testigos	1.00	1.00	1.00

Nota: Los valores están expresados como medias aritméticas de los títulos de Ac.
Medias en una misma columna con diferente letra difieren significativamente.
La interacción Vacuna*Momento no fue significativa (p= 0.734).

Conclusiones de los ensayos dosis respuesta en bovinos y cobayos

- El patrón de respuesta fue similar en ambas especies animales tanto para la Cinética de la respuesta de Ac como para la Magnitud de la respuesta de Ac IHA anti-PI-3. Las respuestas promedio del título de Ac. tendieron a aumentar con las concentraciones crecientes de Ag en bovinos y cobayos. Se observó una relación directamente proporcional entre la Respuesta de Ac y la concentración de Ag en ambas especies, evidenciando un claro efecto dosis respuesta. Sin embargo la capacidad de discriminación de los bovinos entre vacunas de diferente concentración antigénica solo permite diferenciar vacunas de menos de 10⁶ de Ag de PI-3 por dosis de vacunas con concentraciones de Ag de 10⁶ o mayores.
- **La prueba en cobayo demostró mayor capacidad discriminante que el bovino, dado que discriminó significativamente entre vacunas oleosas formuladas con títulos de Ag de 10⁵; 10⁶ y títulos de 10⁷ o mayores.**
- El título de Ac IHA a los 30 días resulta más discriminante en la detección de vacunas de baja concentración de antígenos (D y E), ya que a los 60 días, el título de Ac. se elevó significativamente, en estas vacunas. Esto indicaría que **la medición a los 30 días se puede considerar como el punto óptimo para finalizar la prueba en cobayos**, resultando una prueba económica y rápida para evaluar la potencia de vacunas para PI-3.

2- Análisis de regresión y estimación de puntos de corte para la clasificación de vacunas para PI-3 en bovinos y cobayos

El análisis de regresión de los datos obtenidos a partir de los ensayos dosis respuesta en bovinos y cobayos en la Para establecer los puntos de corte para discriminar vacunas de diferente potencia se ilustra en la figura 6. Para ambas especies el modelo matemático que mejor ajustó a los datos fue un modelo lineal polinómico de 2º grado. El modelo permitió predecir los títulos de Ac IHA promedios inducidos por las vacunas con un 85% de ajuste para cobayos y un 81% de ajuste en bovinos. La F reportada y su valor p corresponden a la significación del modelo (Figura 6).

Curva de regresión ajustada e intervalos de confianza y de predicción

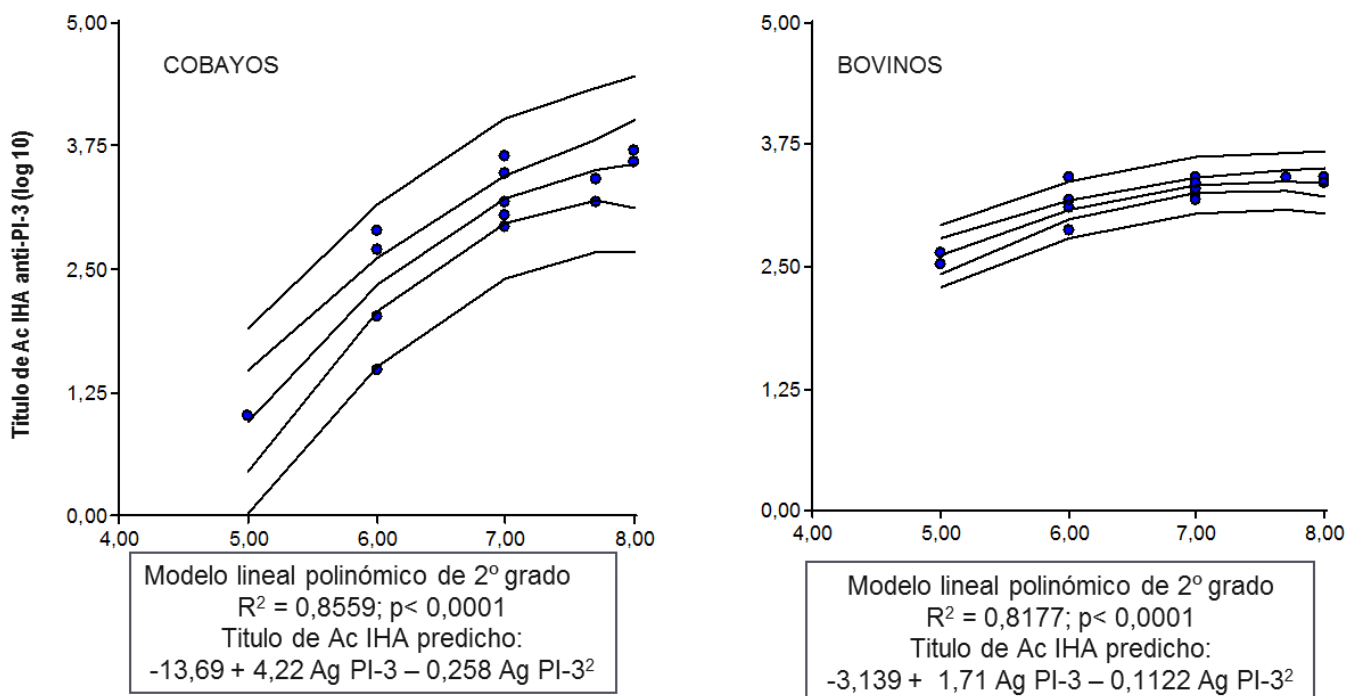


Figura 6. Análisis de Regresión a partir del cual se estiman los puntos de corte para clasificar vacunas de diferente calidad inmunogenica en bovinos y cobayos. Cada punto representa el promedio del log10 de los títulos de Ac inhibidores de la hemoaglutinación anti-PI-3, obtenido en grupos de 5 cobayos/bovinos vacunados con vacunas oleosas con concentraciones crecientes de Ag de PI-3. Se ilustra la curva estimada por el modelo acompañada las bandas correspondientes a los intervalos de confianza y predicción del 90%.

En la tabla 7 se detallan los límites de predicción obtenidos a partir del modelo matemático en bovinos y cobayos. El límite inferior del intervalo de predicción del 90% representa el valor mínimo de Ac IHA promedio que debe inducir una vacuna para cada concentración de Ag en la formulación cuando es administrada a un grupo de un mínimo de 5 cobayos o 5 bovinos, con un 95% de confianza (coverage). Dado que tanto el modelo como la especie de destino fueron capaces de discriminar entre vacunas formuladas con una concentración de 10^6 de Ag de PI-3 o mayor de vacunas con concentraciones inferiores, el punto de corte para declarar una vacuna como de calidad **mínima aceptable** fue el correspondiente el límite de predicción del 90% para dicha concentración antigénica estimado en un título mínimo de 2.8 para bovinos y 1.5 para cobayos. Adicionalmente, aquellas vacunas con concentraciones de antígeno $\geq 10^7$ DICT₅₀/dosis o mayores deben arrojar títulos promedios de Ac no menor a 3.1 en bovinos y 2.4 en cobayos.

Tabla 7. Límites de predicción del 90% estimados a partir del análisis de regresión

Set. Exp	VACUNA	Conc. PI-3 (log10 DICT50/dosis)	Bov T0	Bov T60	Cobayo T30	IPRE(LI) Bov T60	IPRE(LS) Bov T60	IPRE(LI) Cob T30	IPRE(LS) Cob T30
1,1	A	8	2,69	3,41	3,59	3,05	3,67	2,67	4,46
1,1	B	7,7	2,32	3,41	3,41	3,09	3,67	2,67	4,34
1,1	C	7	2,38	3,29	3,18	3,05	3,62	2,39	4,02
1,1	C	7	2,26	3,35	3,18	3,05	3,62	2,39	4,02
1,1	D	6	2,44	3,11	1,48	2,8	3,37	1,52	3,17
1,2	A	8	2,14	3,35	3,71	3,05	3,67	2,67	4,46
1,2	B	7,7	2,51	3,41	3,17	3,09	3,67	2,67	4,34

Validación Estadística del Modelo Cobayo INTA para evaluar la potencia de vacunas contra la infección por el virus de Parainfluenza tipo 3 bovino

1,2	C	7	2,63	3,23	2,93	3,05	3,62	2,39	4,02
1,2	D	6	2,57	2,87	2,02	2,8	3,37	1,52	3,17
2,1	C	7	2,08	3,17	3,47	3,05	3,62	2,39	4,02
2,2	C	7	1,66	3,29	3,05	3,05	3,62	2,39	4,02
2,1	C	7	2,26	3,41	3,65	3,05	3,62	2,39	4,02
2,2	C	7	1,72	3,35	3,47	3,05	3,62	2,39	4,02
2,1	D	6	2,14	3,41	2,88	2,8	3,37	1,52	3,17
2,2	D	6	1,72	3,17	2,69	2,8	3,37	1,52	3,17
2,1	E	5	2,2	2,63	1	2,28	2,93	0,02	1,89
2,2	E	5	1,84	2,51	1	2,28	2,93	0,02	1,89

Tabla 8. Criterio de clasificación del Título de Ac. estimado a partir del modelo Cobayo y la especie de destino

Especie	Criterio de Clasificación Título de Ac IHA antiPI-3		
	Potencia Baja Menor a 10^6	Intermedia satisfactoria Entre 10^6 y 10^7	Muy Satisfactoria 10^7 o mayor
BOVINO	< 2.8	[2.8 a 3.1)	≥ 3.1
cobayo	< 1.5	[1.5 a 2.4)	≥ 2.4

Conclusiones del análisis de regresión y estimación de puntos de corte para clasificar vacunas

- Como criterio de clasificación se pueden establecer límites del título de Ac. en cobayos para identificar la concentración antigénica de las vacunas comerciales. Para el caso de los títulos de Ac. para PI-3 medidos por IHA, el criterio sería calificar como de alta inmunogenicidad (muy satisfactoria) una vacuna con títulos superiores a 2.4 en cobayos (3.1 en bovinos) y vacunas de baja inmunogenicidad si el título alcanzado en promedio no supera 1.5 en cobayos y 2.8 en bovinos. Valores intermedios indicarían que la vacuna posee bajos títulos de antígeno de PI-3 pero que podría ser inmunogénica en bovinos ya primados, considerándose de calidad inmunogénica intermedia-satisfactoria (Tabla 8).
- Es importante destacar que títulos de Ac IHA de 1/32 (en nuestro método con un título en UIHA = $32 * 8 = 256$; expresado en $\log_{10} = 2.4$) se considera el umbral mínimo (threshold) de anticuerpos colostrales que deben poseer los terneros para estar protegidos frente a la infección por PI-3 (Ellis, 2010). El licenciamiento de vacunas para PI-3 en Norteamérica requiere que la vacuna induzca en los bovinos al menos un incremento del título de Ac neutralizantes en suero de una dilución 1:4 postvacunación y una reducción significativa de títulos viral excretado en secreciones nasales en comparación con controles no vacunados. No se requiere reducción de enfermedad (9.CFR).

3- Estudio de concordancia entre los bovinos y el modelo cobayo para clasificar vacunas para PI-3

El estudio de concordancia se realizó inicialmente con un único punto de corte que diferencia vacunas satisfactorias de no satisfactorias (1.5 cobayos; 2.8 bovinos). El grado de concordancia del modelo cobayo y la especie de destino utilizando 39 líneas de comparación (17 vacunas formuladas para el ensayo dosis-rta, 6 vacunas gold standard de concentración de Ag conocida y 16 controles negativos) fue casi perfecto (Kappa ponderado = 0.898). Solo dos vacunas fueron clasificadas como no satisfactorias por el bovino y satisfactorias por el modelo cobayo. Ambas vacunas corresponden a formulaciones acuosas con 10^7 DICT50/dosis que fueron correctamente clasificadas por los cobayos.

Tabla 8. Concordancia entre el bovino y el cobayo. Vacunas Gold Standard

Cobayos (1.5)	Bovinos (2.8)		
	No satisfactoria	Satisfactoria	
No satisfactoria	19	0	19 (48,7%)
Satisfactoria	2	18	20 (51,3%)
	21 -53,80%	18 -46,20%	39
Weighted Kappa ^a	0,898		
Standard error	0,07		
95% CI	0,760 to 1,000		

Si al análisis se incorporan 32 vacunas comerciales de concentración de PI-3 desconocida se obtiene un grado de concordancia óptimo o sustancial (Kappa ponderado = 0.777). Registrándose sólo 8 discordancias sobre un total de 71 comparaciones.

Tabla 9. Concordancia vacunas comerciales y gold std

Cobayo (1.5)	Bovino (2.8)		
	No satisfactoria	Satisfactoria	
No satisfactoria	33	0	33 (46,5%)
Satisfactoria	8	30	38 (53,5%)
	41 (57,7%)	30 (42,3%)	71
Weighted Kappa ^a			0,777
Standard error			0,072
95% CI			0,635 to 0,919

Finalmente si se consideran los dos puntos de corte par discriminar entre vacunas de calidad intermedia de muy buenas, se obtiene un grado de concordancia también muy bueno (Kappa ponderado= 0.757).

Tabla 10. Concordancia considerando dos puntos de corte

Cobayo	Bovino			
	Baja	Intermedia	Satisfactoria	
Baja	34	0	0	34 (47,9%)
Intermedia	4	7	2	13 (18,3%)
Muy satisfactoria	3	4	17	24 (33,8%)
	41 (57,7%)	11 (15,5%)	19 (26,8%)	71
Weighted Kappa ^a				0,757
Standard error				0,064
95% CI				0,632 to 0,882

Conclusiones del análisis de concordancia:

Los resultados obtenidos indican que el modelo cobayo puede utilizarse como una herramienta predictiva de la inmunogenicidad de las vacunas en bovinos con una concordancia sustancial o aceptable.

Perspectivas a futuro:

Conformar los cortes de inmunogenicidad obtenidos evaluando la capacidad protectora de las vacunas de diferente categoría en bovinos vacunados y experimentalmente desafiados con PI-3 en condiciones controladas en boxes. Desarrollar un ELISA para complementar los resultados obtenidos por IHA.

Referencias

- Akkermans, A.M., Hendriksen, C.F., 1999, Statistical evaluation of numbers of animals to be used in vaccine potency testing: a practical approach. *Developments in biological standardization* 101, 255-260.
- Altman, D.G., 1997, *Practical Statistics for Medical Research*. Chapman & Hall/CRC.
- Davies, O.L., 1966, *Métodos Estadísticos aplicados a la investigación y a la producción*, In: AGUILAR.
- Di Rienzo, J.A.G., A. W.; Casanoves, F., 2002, A Multiple Comparison Method based on the Distribution of the Root Node Distance of a Binary Tree obtained by Average Linkage of the Matrix of Euclidean Distances between Treatment Means. *JABES* 7, 1-14.
- Ellis, J.A., 2010, Bovine parainfluenza-3 virus. *The Veterinary clinics of North America* 26, 575-593.
- Littell, R.C., Henry, P.R., Ammerman, C.B., 1998, Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *Journal of animal science* 76, 1216-1231.
- Parreño, V.R., D.; Vena, M.; Izuel, M.; Fillippi, J.; Lopez, M.; Fernandez, F.; Bellinzoni, R. and Marangunich, L. 2010. Development and statistical validation of a guinea pig model as an alternative method for bovine viral vaccine potency testing. In *Symposium: Practical Alternatives to reduce animal testing in quality control of veterinary biologicals in the Americas*, PROSAIA, ed. (Buenos Aires).
- Parreño, V.V., Maria Marta; Rodriguez, Daniela; Izuel, Mercedes; Marangunich, Laura; Lopez, Virginia; Romera, Alejandra; Fillippi, Jorge; Bellinzoni, Rodolfo; Fernandez, Fernando. 2008. Validación estadística de un Modelo Cobayo aplicado al control de calidad inmunogénica de Vacunas Bovinas para los lirus de IBR, PI-3 y Rotavirus. In *IX Congreso Argentino de Virología, SAV, A.*, ed. (Buenos Aires).
- Pryseley, A., Mintiens, K., Knapen, K., Van der Stede, Y.a.M., G 1999. Estimating precision, repeatability and reproducibility from Gaussian and non-Gaussian data: a mixed model approach
- Viera, A.J., Garrett, J.M., 2005, Understanding interobserver agreement: the kappa statistic. *Family medicine* 37, 360-363.
- Westfall, P.H., Tobias, R.D., Rom, D., Wolfinger, R.D., Hochberg, Y., 1999, *Múltiple Comparisons and Multiple Tests using the SAS System*. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

Apéndice I. Vacunas utilizadas en el análisis de concordancia

Nº línea	Tipo de Vacuna	Aplicación VACUNA	SERIE	FORM	Composición (Ag virales)	Ag PI-3	PI3IHABov 0	PI3IHABov 60	PI3IHACob 30
1	DOSISRTA	Calibracion experimental	A	OLEOSA	IBR- BVDV -PI-3	8,00	2,08	3,17	3,47
2	DOSISRTA	Calibracion experimental	A	OLEOSA	IBR- BVDV -PI-3	8,00	1,66	3,29	3,05
3	DOSISRTA	Calibracion experimental	C	OLEOSA	IBR- BVDV -PI-3	7,00	2,26	3,41	3,65
4	DOSISRTA	Calibracion experimental	C	OLEOSA	IBR- BVDV -PI-3	7,00	1,72	3,35	3,47
5	DOSISRTA	Calibracion experimental	D	OLEOSA	IBR- BVDV -PI-3	6,00	2,14	3,41	2,88
6	DOSISRTA	Calibracion experimental	D	OLEOSA	IBR- BVDV -PI-3	6,00	1,72	3,17	2,69
7	DOSISRTA	Calibracion experimental	E	OLEOSA	IBR- BVDV -PI-3	5,00	2,20	2,63	1,00
8	DOSISRTA	Calibracion experimental	E	OLEOSA	IBR- BVDV -PI-3	5,00	1,84	2,51	1,00
42	DOSISRTA	Calibracion experimental	A	OLEOSA	IBR- BVDV -PI-3	8,00	2,14	3,35	3,71
43	DOSISRTA	Calibracion experimental	B	OLEOSA	IBR- BVDV -PI-3	7,70	2,51	3,41	3,17
44	DOSISRTA	Calibracion experimental	C	OLEOSA	IBR- BVDV -PI-3	7,00	2,63	3,23	2,93
45	DOSISRTA	Calibracion experimental	D	OLEOSA	IBR- BVDV -PI-3	6,00	2,57	2,87	2,02
47	DOSISRTA	Calibracion experimental	A	OLEOSA	IBR- BVDV -PI-3	8,00	2,69	3,41	3,59
49	DOSISRTA	Calibracion experimental	B	OLEOSA	IBR- BVDV -PI-3	7,70	2,32	3,41	3,41
50	DOSISRTA	Calibracion experimental	C	OLEOSA	IBR- BVDV -PI-3	7,00	2,38	3,29	3,18
51	DOSISRTA	Calibracion experimental	C	OLEOSA	IBR- BVDV -PI-3	7,00	2,26	3,35	3,18
54	DOSISRTA	Calibracion experimental	D	OLEOSA	IBR- BVDV -PI-3	6,00	2,44	3,11	1,50
20	GOLD STANDARD	Concentracion PI-3 conocida		ACUOSA	IBR- BVDV -PI-3	7,00	2,26	3,28	2,44
27	GOLD STANDARD	Concentracion PI-3 conocida		OLEOSA	IBR- BVDV -PI-3	7,00	2,62	2,56	1,42
48	GOLD STANDARD	Concentracion PI-3 conocida	A	ACUOSA	IBR- BVDV -PI-3	8,00	2,32	3,35	2,93
52	GOLD STANDARD	Concentracion PI-3 conocida	C	ACUOSA	IBR- BVDV -PI-3	7,00	2,32	2,81	1,56
53	GOLD STANDARD	Concentracion PI-3 conocida	C	ACPLUS	IBR- BVDV -PI-3	7,00	2,51	2,75	2,40
63	GOLD STANDARD	Concentracion PI-3 conocida		ACUOSA	IBR- BVDV -PI-3	7,00	1,54	2,26	2,44
9	CONTROL	Testigos/placebos		OLEOSA		0,00	1,96	2,02	1,00
10	CONTROL	Testigos/placebos		OLEOSA		0,00	1,70	1,90	1,00
46	CONTROL	Testigos/placebos		OLEOSA		0,00	2,31	2,20	1,00
55	CONTROL	Testigos/placebos		OLEOSA		0,00	2,08	2,26	1,00
19	CONTROL	Testigos no vacunados					2,38	2,50	1,00
24	CONTROL	Testigos no vacunados					2,10	2,20	1,00

Validación Estadística del Modelo Cobayo INTA para evaluar la potencia de vacunas contra la infección por el virus de Parainfluenza tipo 3 bovino

Nº línea	Tipo de Vacuna	Aplicación VACUNA	SERIE	FORM	Composición (Ag virales)	Ag PI-3	PI3IHABov 0	PI3IHABov 60	PI3IHACob 30
29	CONTROL	Testigos no vacunados					2,68	2,38	1,00
35	CONTROL	Testigos no vacunados					2,75	2,75	1,00
41	CONTROL	Testigos no vacunados					2,75	2,75	1,00
59	CONTROL	Testigos no vacunados					2,14	1,96	1,00
62	CONTROL	Testigos no vacunados					1,75	1,65	1,00
64	CONTROL	Testigos no vacunados					1,69	1,74	1,00
69	CONTROL	Testigos no vacunados					1,42	1,12	1,00
72	CONTROL	Testigos no vacunados					1,72	1,45	1,00
77	CONTROL	Testigos no vacunados					2,57	2,38	1,00
78	CONTROL	Testigos no vacunados					2,38	2,2	1,00
21	COMERCIAL	Síndrome respiratorio	33	ACUOSA	IBR- BVDV -PI-3		2,17	3,10	1,84
22	COMERCIAL	Multi proposito	21	OLEOSA	IBR- BVDV -PI-3 - RV		2,07	2,83	2,26
23	COMERCIAL	Pre-servicio	9	OLEDE	IBR- BVDV -PI-3		2,11	2,53	1,36
25	COMERCIAL	Multi proposito	20	OLEOSA	IBR- BVDV -PI-3 - RV		2,20	2,80	2,32
26	COMERCIAL	Queratoconjuntivitis	26	OLEOSA	IBR		2,38	2,26	1,00
28	COMERCIAL	Pre-servicio	9	OLEDE	IBR- BVDV -PI-3		1,96	2,20	1,00
30	COMERCIAL	Multi proposito	19	OLEOSA	IBR- BVDV -PI-3 - RV		2,38	3,17	2,75
31	COMERCIAL	Síndrome respiratorio	4	OLEDE	IBR- BVDV -PI-3		2,32	2,62	1,90
32	COMERCIAL	Síndrome respiratorio	5	OLEOSA	IBR- BVDV -PI-3		2,38	2,99	2,99
33	COMERCIAL	Síndrome respiratorio	1	ACUOSA	IBR - BVDV - PI-3 - BRSV		2,44	2,05	2,38
34	COMERCIAL	Pneumonia	6	OLEOSA	PI-3		2,38	2,99	2,93
36	COMERCIAL	Multi proposito	19	OLEOSA	IBR- BVDV -PI-3 - RV		2,38	3,17	2,87
37	COMERCIAL	Síndrome respiratorio	4	OLEDE	IBR- BVDV -PI-3		2,32	2,62	2,43
38	COMERCIAL	Síndrome respiratorio	5	OLEOSA	IBR - BVDV - PI-3 - BRSV		2,38	2,99	2,99
39	COMERCIAL	Síndrome respiratorio	1	ACUOSA	IBR - BVDV - PI-3 - BRSV		2,44	2,05	2,38
40	COMERCIAL	Pneumonia	6	OLEOSA	IBR- BVDV -PI-3		2,38	2,99	3,25
56	COMERCIAL	Síndrome respiratorio	32	ACUOSA	IBR- BVDV -PI-3		1,90	2,57	2,38
60	COMERCIAL	Síndrome respiratorio	45	ACUOSA	IBR- BVDV -PI-3			2,03	1,00
61	COMERCIAL	Síndrome respiratorio	31	ACUOSA	IBR- BVDV -PI-3		1,95	2,12	1,45
67	COMERCIAL	Síndrome respiratorio	236-152	ACUOSA	IBR- BVDV -PI-3		1,45	1,21	1,00
68	COMERCIAL	Síndrome respiratorio	2	OLEDE	IBR- BVDV -PI-3		1,21	1,12	1,00
70	COMERCIAL	Síndrome respiratorio	18	ACUOSA	IBR- BVDV -PI-3		1,69	2,14	2,51

Validación Estadística del Modelo Cobayo INTA para evaluar la potencia de vacunas contra la infección por el virus de Parainfluenza tipo 3 bovino

Nº línea	Tipo de Vacuna	Aplicación VACUNA	SERIE	FORM	Composición (Ag virales)	Ag PI-3	PI3IHABov 0	PI3IHABov 60	PI3IHACob 30
71	COMERCIAL	Síndrome respiratorio	32	ACUOSA	IBR- BVDV -PI-3			1,60	1,00
73	COMERCIAL	Síndrome respiratorio	58	ACUOSA	IBR- BVDV -PI-3		2,07	2,39	1,30
74	COMERCIAL	Síndrome respiratorio	58	ACUOSA	IBR- BVDV -PI-3		2,07	2,39	1,00
75	COMERCIAL	Síndrome respiratorio	2	ACUOSA	IBR- BVDV -PI-3		1,90	2,43	1,00
76	COMERCIAL	Síndrome respiratorio	2	ACUOSA	IBR- BVDV -PI-3		2,13	2,38	1,34
79	COMERCIAL	Síndrome respiratorio		ACUOSA	IBR - BVDV - PI-3 - BRSV		2,51	2,88	1,53
80	COMERCIAL	Síndrome reproductivo		ACUOSA	IBR- BVDV		2,66	2,66	1,24
81	COMERCIAL	Síndrome respiratorio	1	ACUOSA	IBR - BVDV - PI-3 - BRSV		2,73	2,88	1,54
82	COMERCIAL	Síndrome respiratorio	2	ACUOSA	IBR - BVDV - PI-3 - BRSV		2,51	2,81	1,72
83	COMERCIAL	Síndrome respiratorio	3	ACUOSA	IBR - BVDV - PI-3 - BRSV		2,51	2,61	1,48