USO PRACTICO E INTERPRETACIÓN DE LA SEROLOGÍA EN CAMPO.

Joaquín Girón, MSD AH

El objetivo final de las empresas es tener lotes con muy buenas producciones y económicamente rentables, lógicamente "*un lote sano produce más que un lote enfermo"* y por lo tanto todos los departamentos involucrados en la producción quieren mantener a las aves en el mejor estado sanitario posible. Para ello además de una alimentación adecuada y un buen manejo (control de las condiciones ambientales, bioseguridad) se necesita un buen programa de vacunación.

Para conocer el funcionamiento del programa vacunal se recurre a la serología, en sus diferentes técnicas (aglutinación rápida en placa, inhibición de la hemoaglutinación y ELISA), obteniendo las empresas una información útil acerca de la aplicación de las vacunas o de si ha habido contacto con algún virus no incluido en dicho programa. Algunas empresas sólo chequean lotes con problemas, mientras que otras trabajan de forma más continuada para establecer su propia "base de datos", El problema sucede al recibir los boletines de serología, en los que a veces no se da una interpretación práctica de los resultados y en no explicar el significado de algunos términos. Por ejemplo, cuál es el significado de coeficiente de variación, índice de vacunación, media geométrica, tasas de anticuerpos expresados en unidades o en logaritmos base 2, tasas protectivas o no frente a desafíos de campo, los niveles de anticuerpos son los correspondientes al programa vacunal llevado, etc. La idea de este documento es dar esa información para que las empresas sean capaces de obtener la máxima información que se obtiene empleando la serología.

La estructura del documento va a ser la siguiente:

- toma de muestras, número de muestras, conservación y envío
- técnicas analíticas más comunes (breve descripción de ellas).
- resultados serológicos por los diferentes ELISA

CARACTERISTICAS DE LAS MUESTRAS A ANALIZAR

Este apartado es el más crucial e importante ya que sin una buena toma de muestras en cantidad y calidad no pueden hacerse unas buenas determinaciones serológicas.

La gran mayoría de las determinaciones se hacen con suero (obtenido tras dejar coagular una muestra de sangre y esperando a que el coágulo se retraiga) o yema.

Las muestras en los pollos se suelen tomar al primer día para conocer su nivel de inmunidad maternal y determinar una fecha de vacunación, y al sacrificio (6 – 7 semanas) para conocer la aplicación de las diferentes vacunas (en la sala o en el campo). Las ponedoras y reproductoras pueden chequearse una o dos veces en recría y unas 3 veces en producción.

El volumen de extracción dependerá del número de análisis solicitados y de la técnica empleada. Generalmente es suficiente con 3 ml de sangre que pueden dar lugar a 1 ml de suero

Como se dijo anteriormente es muy importante tomar un número adecuado de muestras que nos permita obtener resultados válidos. Esta cifra dependerá de la *prevalencia* (número de enfermos en el momento del muestreo o porcentaje de aves que no se inmunizan bien en una vacunación) y el tamaño del lote (que influye más cuando hay menos animales). También influyen la sensibilidad y especificidad del kit o técnica a emplear. Es muy importante que las muestras sean tomadas de toda la nave y, si son pollitas en recría se deberían tomar de todos los pasillos, como mínimo, y si fuera posible de diferentes alturas.

Hay fórmulas matemáticas que indican el número de muestras a tomar para poder detectar una infección, en al menos un suero, con un grado de confianza del 95 %, considerando la prevalencia y el tamaño del lote. En la siguiente tabla se muestran el número de muestras a tomar según la prevalencia, expresada en porcentaje, y el tamaño del lote:

Tamaño lote	Prevalencia en %										
	50	**30**	**25**	**20**	**15**	**10**	**5**	**2**	**1**	**0,5**	**0,1**
20	4	7	9	10	12	16	19	20	20	20	20
100	5	9	10	13	17	25	45	78	100	100	100
500	5	9	11	14	19	28	56	129	349	349	500
1000	5	9	11	14	19	29	57	138	450	450	950
5000	5	9	11	14	19	29	59	147	564	564	2253
10000	5	9	11	14	19	29	59	148	581	581	2558
• **10000**	5	9	11	14	19	29	59	149	596	596	2995

En lotes entre 1000 a > 100.000 aves, con una prevalencia del 10 %, el número de muestras a tomar es 29 en ambos lotes. Sin embargo si la prevalencia de la infección fuera del 2 % el número de muestras a tomar serían entre 138 a 146.

En la práctica diaria es imposible tomar tantas muestras y por lo tanto necesitamos responder a la pregunta ¿cuántos sueros necesitamos para obtener un resultado válido? Como se ha dicho anteriormente dependerá de: prevalencia de la enfermedad, variación esperada entre aves (no todas las aves de un lotes responden igual al programa vacunal llevado), nivel de seguridad buscado, tipo enfermedad y tipo de kit empleado. Generalmente entre 12 y 24 sueros son suficientes.

Los laboratorios fabricantes de kit ELISA recomiendan un número mínimo de sueros para obtener unos resultados válidos dependiendo de la prevalencia de la enfermedad y del grado de confianza del kit. Esta cifra oscila entre 10 a 23 sueros, dependiendo de la prevalencia estimada. En la siguiente tabla se indica la probabilidad de encontrar un suero indicativo de infección o un ave mal vacunada, según el número de muestras tomadas y el grado de prevalencia.

% de detección si el tamaño de muestra es de

% prevalencia	5 sueros	10 sueros	15 sueros	23 sueros
2	10	30	50	50
5	25	50	90	**100**
10	50	90	**100**	**100**
15	50	67	**100**	**100**
33	90	**100**	**100**	**100**

Tomando 23 sueros tenemos un 100 % de probabilidad de encontrar un suero positivo si la prevalencia de la infección dentro de un lote es del 5 %. Esta cifra debería aumentarse en el caso de prevalencias del 2 % o menores.

Las muestras deberán mandarse lo más rápido posible al laboratorio. Siempre es preferible enviar suero y no sangre completa. Si no es posible el envío rápido las muestras se deben guardar en frigorífico, desueradas, ya sea en refrigeración o congelación.

Es muy importante enviar alguna información acerca del lote: tipo de aves, edad, programa vacunal llevado, vías de administración, cuadro clínico observado y determinaciones a realizar. Este punto es uno de los que en su mayoría no se realiza.

DESCRIPCIÓN DE LAS TÉCNICAS MÁS COMUNES EN AVICULTURA

La medición de las reacciones antígeno-anticuerpo con fines diagnósticos se denomina serología. El suero es la fuente más común de anticuerpos empleados en las distintas técnicas serológicas. En determinadas ocasiones se puede trabajar con la yema de huevo.

La presencia de anticuerpos específicos contra un microorganismo dado nos indica que hubo una exposición previa, ya sea por vacunación o por contacto, sin embargo no nos da plena seguridad de que dicho agente sea el responsable de la enfermedad. Para poder confirmar el diagnóstico es imprescindible hacer una nueva toma de muestras a las 3 - 4 semanas y, comprobar si ha habido seroconversión, es decir un aumento de títulos en 4 veces Este aumento junto a la existencia de problemas puede confirmar el diagnóstico.

Un factor importante en la serología es la posibilidad de encontrar falsos negativos o falsos positivos. Ambas determinaciones están relacionadas con la *sensibilidad y especificidad* de la prueba diagnostica.

Podríamos definir **Sensibilidad** como la capacidad de un test para detectar niveles bajos de anticuerpos o la proporción de animales infectados que dan resultado positivo en el test. **Especificidad** es la proporción de animales libres de la infección que dan un resultado negativo en el test o la capacidad de un test para proporcionar un resultado negativo cuando el animal no está infectado.

		Infectados		
Resultado de la prueba		SI	NO	
	Positivo	A	B	a + b
	Negativo	C	D	c + d
		a + c	b + d	a + b + c + d

Las causas de una sensibilidad menor del 100 %, aparición de "falsos negativos", son las siguientes: la prueba "per se", tomar muestras demasiado pronto o demasiado tarde, por la existencia de bajos niveles de anticuerpos (vacunaciones spray al primer día) y por inmunosupresión. Las causas de una especificidad menor del 100 %, aparición de "falsos positivos", pueden ser debidas a: la prueba "per se", mala calidad del suero, reacciones cruzadas con anticuerpos producidos frente a antígenos relacionados, por ejemplo: reacciones entre diferentes serotipos de bronquitis infecciosa, reacciones entre micoplasma gallisepticum y micoplasma synoviae, etc., o por la existencia de reacciones cruzadas por otros factores como es el caso de la aglutinación rápida en placa de micoplasma gallisepticum y synoviae. Generalmente se admite que las pruebas muy sensibles tienden a ser, en términos relativos, poco específicas, y las muy específicas, en general, tienden a ser poco sensibles. Es raro, que una misma prueba cumpla al 100 % los requisitos de sensibilidad y especificidad.

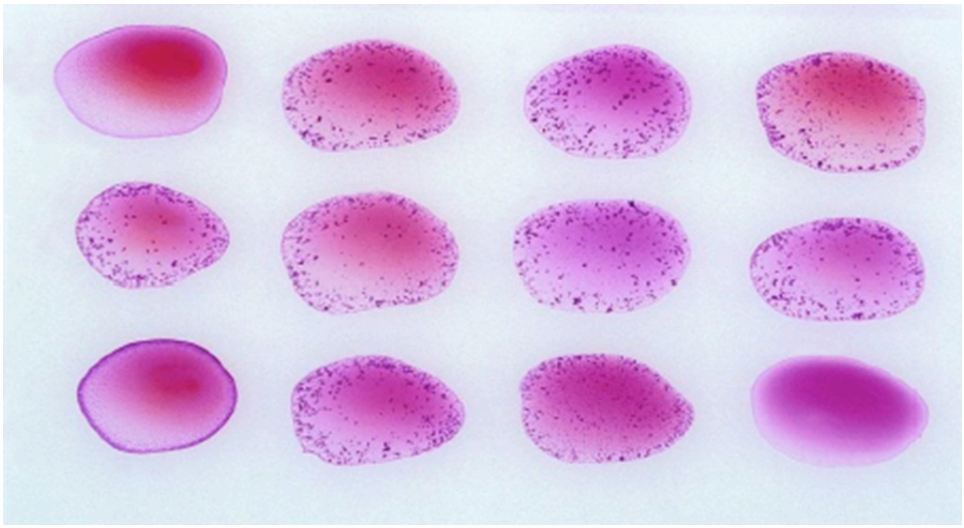
Otro factor importante en las pruebas diagnosticas es la **repetibilidad** conocida como la capacidad de un test para dar resultados constantes para la misma muestra en pruebas repetidas.

Antes de hacer un breve resumen de las principales técnicas más comunes en avicultura conviene recordar que casi todos los kits comerciales están enfocados a trabajar en anticuerpos Ig G (Y), pero que otros como Ig A (es el más importante en las secreciones de intestino y tráquea), Ig M (anticuerpo de aparición más temprana ante una vacunación o infección) no suelen medidos por las técnicas serológicas comunes (IHA, ELISA) y que la inmunidad local y celular tampoco son medidas por reacciones serológicas habituales.

1) AGLUTINACIÓN RÁPIDA EN PLACA (A.R.P.)

La unión antígeno-anticuerpo se demuestra por la aparición de grumos de distinto tamaño en la placa (vidrio o porcelana) al mezclar una gota de suero y una de antígeno. Se puede trabajar con sangre entera o suero y ha sido una de las primeras pruebas diagnosticas empleadas en el control de enfermedades avícolas. Con esta técnica se han analizado infecciones por Micoplasma gallisepticum (M. g.), M. synoviae (M. s.), Salmonella pullorum (S.p.), Salmonella enteritidis (S.e.), Salmonella typhimurium (S.t) y M. meleagridis (M.m.).

La lectura se hace a los 2 minutos de la mezcla, como máximo. El resultado es positivo si existen grumos (ver foto). Como es una prueba poco especifica hay que poner sueros controles, tanto positivos como negativos, para tener una mayor seguridad en la lectura. Hay otros muchos factores que influyen en la lectura: calidad del suero, manipulación del suero y del antígeno, vacunas aplicadas, etc.



2) INHIBICIÓN DE LA HEMOAGLUTINACIÓN (IHA)

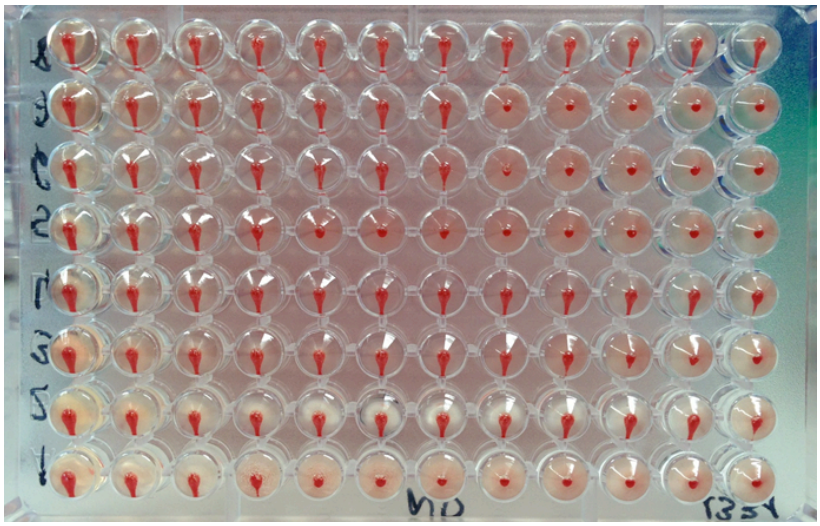
Algunos virus aviares, como Newcastle, Influenza, Bronquitis (tras un tratamiento enzimático) y Adenovirus (cepa 127 o BC- 1 4), y algunas bacterias y micoplasmas son capaces de aglutinar eritrocitos de diversas especies. La inhibición de esta capacidad por anticuerpos específicos es la base de la técnica IHA. Esta técnica ha sido muy empleada para el control de algunas enfermedades, como Newcastle, y para el control de diversos programas de vacunación.

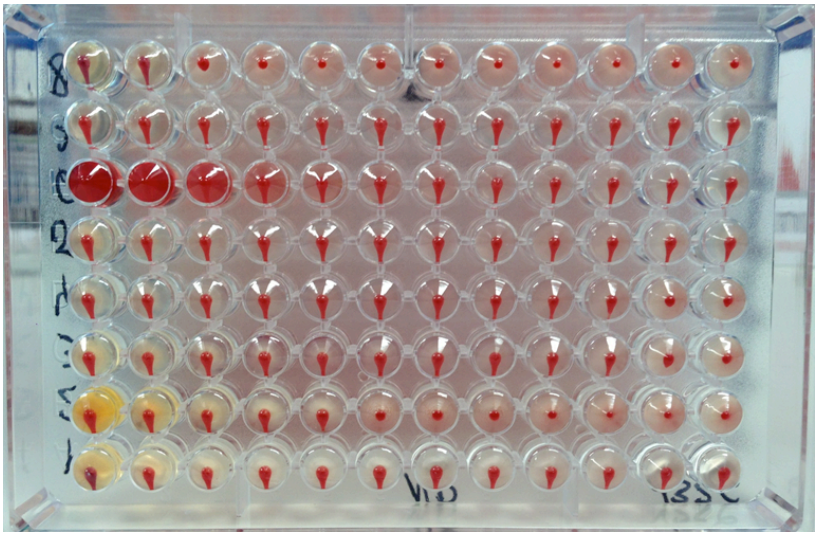
La técnica más empleada es la de antígeno constante y suero diluido con una cantidad conocida de eritrocitos en microplacas.

Descripción de la técnica.-

Se emplean placas microtiter de 96 pocillos (8 filas y 12 columnas) en las que se pueden analizar 8 sueros (uno por cada fila) que se van diluyendo de forma seriada a lo largo de las 12 columnas. En cada pocillo se han añadido las mismas cantidades de PBS, antígeno y, glóbulos rojos. El antígeno utilizado debe tener entre 4 u 8 unidades hemoaglutinantes (UHA). El título es ella columna o pocillo

El título del suero será el de la dilución del último pocillo en el que haya una completa inhibición de la hemoaglutinación.





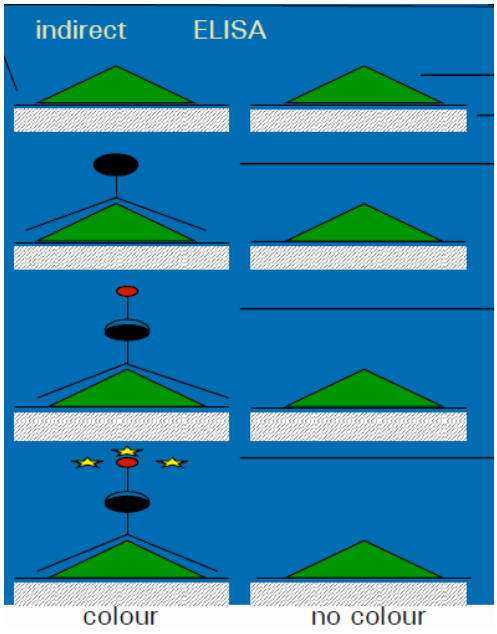
4) ELISA

Estas siglas pertenecen a la denominación inglesa enzyme linked inmunosorbent assay (prueba inmunoenzimática ligada a enzimas).
Es la técnica que más desarrollo ha tenido en el sector avícola y en el de la ganadería en general en los últimos años. La mayoría de las enfermedades pueden diagnosticarse por esta técnica. Los tipos ELISA más comunes en avicultura son el Indirecto y el de Bloqueo.

La descripción, a grandes rasgos, del ELISA INDIRECTO es la siguiente:

1) Se emplean placas de 8 filas y 12 columnas, es decir 96 pocillos que tienen fijado al antígeno en su pared.

2) Adición a 90 o 92 pocillos, según el fabricante, de los sueros problema. Los sueros se diluyen, generalmente a 1:500. El resto de los pocillos son llenados con los sueros control (positivos y negativos) mandados por el fabricante. Si los sueros tienen anticuerpos específicos del antígeno fijado a la placa se unirán a él formando un complejo antígeno-anticuerpo.



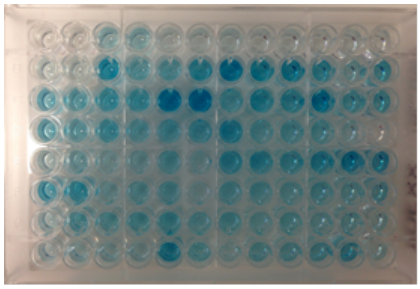
3) Se realiza un lavado de la placa, para eliminar las fracciones no unidas.

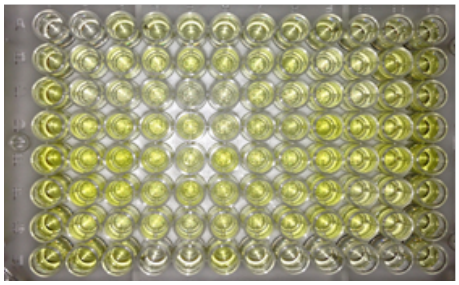
4) Adición del conjugado (anti Ig G de pollo unida a la enzima peroxidasa) que se unirá al complejo antígeno-anticuerpo.

5) Tras un lavado para eliminar los restos no fijados se adiciona el substrato con un cromógeno que reaccionará con el conjugado produciendo color. Generalmente a mayor cantidad de color más nivel de anticuerpos hay en el suero. La cantidad de color se mide por el lector ELISA y se expresa como densidades ópticas (D. O.). Este valor se compara con los valores de lo sueros positivos y negativos obteniéndose una " sample to positive o s/p ratio ". El título de cada muestra se calcula utilizando una ecuación de regresión para dicha s/p.

Todas las fases se hacen con períodos de incubación de la placa a una temperatura fijada y la reacción final (aparición del color) se suele parar pasado un tiempo prefijado.

La lectura se realiza por el lector (espectrofotómetro) que mide las absorbancias de la muestra utilizando diferentes filtros. Los colores finales varían según el fabricante de los kits, por ejemplo es azul (Idexx) o amarillo (Biochek).

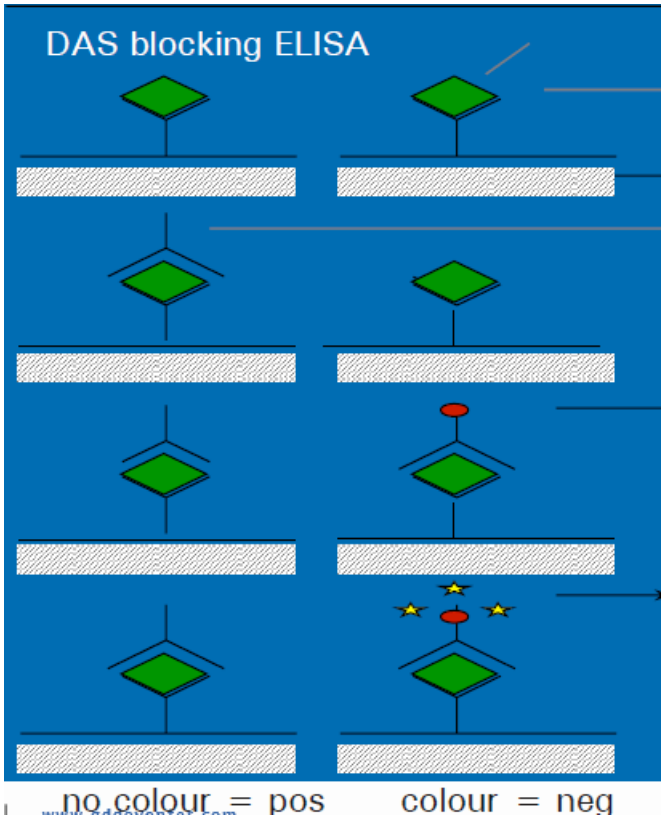




La descripción, a grandes rasgos, del ELISA DE BLOQUEO es la siguiente:

1) Se emplean placas de 8 filas y 12 columnas, es decir 96 pocillos que tienen fijado al antígeno en su pared.

2) Adición a 90 o 92 pocillos, según el fabricante, de los sueros problema. Los sueros problemas se diluyen a 1:2 (salmonelas), 1:10 o 1:100 (anemia). El resto de los pocillos son llenados con los sueros control (positivos y negativos) mandados por el fabricante. Si los sueros tienen anticuerpos específicos del antígeno fijado a la placa se unirán a él formando un complejo antígeno-anticuerpo.



3) Se realiza un lavado de la placa, para eliminar las fracciones no unidas.

4) El conjugado tiene anticuerpos específicos del antígeno fijado en la placa, no es un anti Ig G de pollo. Por lo tanto se unirá más donde haya más antígeno libre fijado a la placa y menos donde haya más anticuerpos unidos al antígeno fijado.

5) Lavado de la placa y adición del substrato. En este caso la existencia de más color indica menor nivel de anticuerpos y el mayor título de anticuerpos corresponde a pocillos con menos color.

La comparación de las D. 0. del suero problema, sueros positivos y negativos da lugar a una " s/n ratio o sample to negative " .

En ambos casos el lector transforma las densidades ópticas en valores, expresados en unidades, que son agrupados en grupos para facilitar la visión del resultado. La clasificación en grupos y unidades es diferente entre los diversos fabricantes de kit ELISA e incluso dentro de las diferentes patologías analizadas por un mismo fabricante.

De forma general, en el Elisa Indirecto el grupo 0 es considerado como negativo y el grupo 1 en algunos es dudoso (Hipra) o positivo (Idexx y Biochek). Un caso especial es el kit de Newcastle de Hipra en el que son negativos los grupos 0, 1 y 2 y es dudoso el grupo 3. A continuación se van a mostrar las correspondencias entre unidades ELISA y grupos para los kits de Idexx

Grupo	Unidades	Unidades en MG y MS
0	0 – 396	0 – 396
1	397 – 999	397 – 1077
2	1000 – 1999	1078 – 1500
3	2000 – 2999	1501 – 1999
4	3000 – 3999	2000 – 2999
5	4000 – 4999	3000 – 3999
6	5000 – 5999	4000 – 4999
7	6000 – 7999	5000 – 5999
8	8000 – 9999	6000 – 7999
9	10000 – 11999	8000 – 9999
10	12000 – 13999	10000 – 11999
11	14000 – 15999	12000 – 13999
12	16000 – 17999	14000 – 15999
13	18000 – 19999	16000 – 17999
14	20000 – 21999	18000 – 19999
15	22000 – 23999	20000 – 21999
16	24000 - 27999	22000 – 23999
17	28000 – 31999	24000 – 27999
18	≥ 32000	28000 – 31999

La distribución de unidades y grupos en el caso de emplear kits de Biochek es la siguiente:

Grupos	BI	Gumboro	NDV	TRT	ILT	REO	EDS	MG/MG+MS	AE	CAV
0	833	389	1158	1655	1000	1351	649	667	1070	723
1	2000	1000	2000	2000	2000	2000	1249	1249	2000	1000
2	3000	2000	3000	3000	3000	3000	2000	2000	3000	2000
3	4000	3000	4000	4000	4000	4000	3000	3000	4000	3000
4	5000	4000	5000	5000	5000	5000	4000	4000	5000	4000
5	6000	5000	6000	6000	6000	6000	6000	6000	6000	5000
6	8000	6000	8000	8000	7000	8000	8000	8000	7000	6000
7	10.000	8000	10.000	10.000	8.000	10.000	10.000	10.000	8.000	7000
8	12.000	10.000	12.000	12.000	10.000	12.000	12.000	12.000	9.000	8000
9	14.000	12.000	14.000	14.000	12.000	14.000	14.000	14.000	11.000	10.000
10	17.000	14.000	17.000	17.000	14.000	17.000	17.000	17.000	13.000	12.000
11	20.000	16.000	20.000	20.000	16.000	20.000	20.000	20.000	15.000	14.000
12	24.000	19.000	24.000	24.000	19.000	24.000	24.000	24.000	17.000	16.000
13	28.000	22.000	28.000	28.000	22.000	28.000	28.000	28.000	20.000	18.000
14	35.000	26.000	35.000	35.000	26.000	35.000	35.000	35.000	23.000	20.000
15	45.000	30.000	45.000	45.000	30.000	45.000	45.000	45.000	26.000	24.000
16	55.000	35.000	55.000	55.000	35.000	55.000	55.000	55.000	30.000	28.000
17	70.000	40.000	70.000	70.000	40.000	70.000	70.000	70.000	35.000	32.000
18	> 70.000	> 40.000	> 70.000	> 70.000	> 40.000	> 70.000	> 70.000	> 70.000	> 35.000	>32.000

La distribución de unidades y grupos en el caso de emplear kits de Hipra es la siguiente:

Grupo	Gumboro	TRT	BI	ILT	ND	EDS	REO
0	< 268	< 90	< 505	< 388	< 68	<548	< 399
1	268 - 356	90 - 195	505 - 710	388 - 688	68 - 136	548 - 921	399 - 913
2	357 - 1000	196 -1000	711 - 1000	689 - 1000	136 - 219	921 - 2000	913 - 2000
3	1000 - 2000	1000 - 2000	1000 - 2000	1000 - 2000	219 - 317	2000 - 3000	2000 - 5000
4	2000 - 3000	2000 - 3000	2000 - 4000	2000 - 3000	317 - 2164	3000 - 4000	5000 - 7000
5	3000 - 4000	3000 - 4000	4000 - 6000	3000 - 4000	2164 - 4074	4000 - 5000	7000 - 9000
6	4000 - 5000	4000 - 5000	6000 - 9000	4000 - 5000	4074 - 6391	5000 - 6000	9000 - 11000
7	5000 - 6000	5000 - 6000	9000 - 15000	5000 - 6000	6391 - 9068	6000 - 7000	11000 - 13000
8	6000 - 7000	6000 - 7000	15000 - 27000	6000 - 7000	9068 - 12073	7000 - 8000	13000 - 15000
9	7000 - 8000	7000 - 8000	> 27000	7000 - 8000	12073 - 15381	8000 - 10000	> 15000
10	8000 - 9000	8000 - 9000		8000 - 10000	> 15381	>10000	
11	9000 - 10000	9000 - 10000		> 10000			
12	10000 - 13000	10000 - 11000					
13	13000 - 16000	11000 - 12000					
14	> 16000	12000 - 13000					
15		13000 - 14000					
16		> 14000					

RESULTADOS SEROLOGICOS EN LOS DIFERENTES ELISA

La distribución anterior de unidades y grupos nos muestra que es imposible, o muy difícil, trabajar con todos ellos al mismo tiempo para hacer una base de datos serológica, ya que los valores en unidades son muy diferentes. Por ejemplo en TRT los valores máximos en Biochek son > 70.000, en Idexx > 32.000 y en Hipra > 8000. En estos casos se recomienda trabajar con porcentajes de seroconversión a la vacunación y en comprobar si los niveles de anticuerpos encontrados son similares a los recomendados por el fabricante del kit.

Los boletines ELISA nos dan mucha información, pero hay alguna que es más importante que otra. Todos los fabricantes nos indican la media aritmética (amt) y la geométrica (gmt), desviación estándar (ds), coeficiente de variación (CV %), así como el rango de los valores encontrados (suero con menor y mayor titulación). Los más importantes son las medias, tanto amt como gmt, y el CV %.

La media aritmética (amt) es el valor a emplear cuando los valores tengan un CV % bajo, pero si hay valores muy altos o muy bajos se debería emplear la media geométrica (gmt), ya que es menos sensible a los valores extremos (altos y/o bajos). El CV % es el cociente obtenido al dividir la desviación estándar (dispersión de los valores analizados con respecto a la media) y el título medio (expresado en porcentaje). El dato de CV es un indicador excelente de la calidad de la vacunación; en general valores inferiores al 40 % son considerados buenos y los superiores al 50 % deberían mejorarse.

Algunos fabricantes indican los niveles de anticuerpos producidos por determinadas vacunaciones, de esta forma la empresa podrá compararlos y decidir si están dentro de la normalidad o no. Esto facilita la interpretación pero lo lógico es que cada empresa desarrolle su propia base de datos.

A continuación se indican algunos resultados serológicos sugeridos por Biochek e Hipra en sus guías de interpretación

Patología	Vacunación	Biochek	Hipra
Gumboro	Vivas intermedias	2500 – 9000	2000 – 4000
	Intermedia plus	6000 – 14000	4000 – 6000
	Vivas + inactivadas	7000 – 20000	≥ 7000
TRT	Viva	1000 – 4000	90 – 2000
	Viva + inactivada	7000 – 25000	≤ 10000
BI	Mass	300 – 1500	505 – 2000
	Mass + variante	1000 – 6000	1000 – 5000
	Vivas + inactivadas	6000 – 17000	4000 – 10000
NEWCASTLE	Viva	2000 – 5000	288 - 3000
	Viva + inactivada	4000 – 12000	1000 – 5000
	Vivas + inactivada	10000 – 25000	3000 – 10000
ILT	Viva	1000 – 3000	≥ 2000
EDS	Inactivada	1000 – 4000	≥ 2000
REO	Viva	2000 – 5000	≤ 5000
	Viva + inactivada	7000 – 15000	5000 – 9000

Estos resultados son sugeridos por los fabricantes, pero las empresas pueden tener otros resultados diferentes si las condiciones de manejo y presión viral son distintas.

CONCLUSIONES

Las empresas avícolas trabajan mucho en prevención y la serología es una herramienta que es muy útil en la prevención inicial, junto a la bioseguridad y a la vacunación. Gracias a la serología el técnico puede conocer si los niveles de anticuerpos están relacionados con el programa vacunal llevado. Si estos son más elevados podrá cambiar dicho programa para garantizar que el lote siga en buenas condiciones de salud.

La serología puede emplearse para:

- Conocer la inmunidad maternal en los aves de un día (correlacionadas con el nivel de anticuerpos de los reproductores)
- Erradicar enfermedades
- Control de vacunaciones en el campo
- Predicción de fechas de vacunación
- Diagnosticar infecciones

Para que las empresas puedan obtener toda la información es imprescindible que cada una de ellas tenga su base de datos (distribución de los niveles de anticuerpos en una zona determinada y durante un tiempo fijado). Un punto muy importante y que nunca debe olvidarse es que la existencia de tasas altas de anticuerpos no significan enfermedad; para poder diagnosticar enfermedad las aves deben mostrar clínica.