

Interpretación y Aplicabilidad de Exámenes Serológicos en Situaciones de Campo

Guillermo Zavala, MVZ, MAM, MS, PhD, Dipl. ACPV
Georgia Poultry Laboratory Network
P.O. Box 20, 4457 Oakwood Road
Oakwood, Georgia 30566
gzavala@gapoultrylab.org

Resumen. Debido a la posibilidad de procesar grandes volúmenes de muestras fácilmente y a un costo relativamente bajo, la serología continúa siendo una de las herramientas de diagnóstico y vigilancia epidemiológica más utilizadas. En este artículo se aborda la importancia de: a) vigilancia epidemiológica; b) creación y organización de una base de datos serológicos; c) mantenimiento de una seroteca; d) análisis e interpretación de datos serológicos en función de vacunaciones e infecciones de campo; e) aplicación de la serología en investigaciones de campo.

Vigilancia epidemiológica. La vigilancia epidemiológica tiene como objetivo fundamental contribuir en la prevención, detección y control de enfermedades. Una herramienta esencial para estos objetivos son en conjunto los métodos serológicos, entre los que se encuentran las pruebas ELISA, inhibición de la hemoaglutinación (IH) e inmunodifusión (inmunoprecipitación) en gel de agar (PGA). Aunque existen otros métodos de laboratorio, las anteriores (ELISA, IH y PGA) son las más comúnmente utilizadas para la vigilancia de las enfermedades aviares más comunes. La vigilancia serológica de enfermedades es fundamental para poder estimar posibles variaciones en la respuesta inmunológica a vacunaciones o infecciones de campo. Además, la vigilancia serológica es esencial para poder detectar en forma fácil, oportuna, económica y práctica brotes de enfermedades exóticas o poco comunes. Aunque la serología es de gran utilidad para estos objetivos generales, en muchas ocasiones es imprescindible

complementar la serología con otros ensayos de laboratorio incluyendo el aislamiento e identificación de patógenos o los métodos de detección molecular de patógenos aviares. Una de las fallas más comunes en cuanto a programas de vigilancia epidemiológica no es tanto la ausencia de datos de serología sino la falta de organización de estos datos de manera que sea posible su análisis en forma rápida y objetiva. Es de primordial importancia organizar estos datos en forma cronológica y por edades, y además contar con una estrategia clara de muestreo para poder obtener datos de valor práctico y económico en el manejo de enfermedades infecciosas.

Creación y organización de base de datos serológicos. Los aspectos más importantes para la la creación de una base de datos serológicos útil incluyen:

- a) **Edades estratégicas.** Obtención de muestras en edades estratégicas, evitando edades innecesarias. Por ejemplo, en pollos de engorde la edad más importante para serología es la edad de sacrificio. Los datos serológicos de edades intermedias casi siempre son de mínima utilidad. En aves de vida prolongada (reproductoras y ponedoras) las edades más importantes son entre las 6 y 60 semanas de edad (o después de la pelecha o remplume), con intervalos de mínimo 8-10 semanas entre cada valor, especialmente a partir de 6 semanas después de la última vacunación con vacunas inactivadas aplicadas en crianza.
- b) **Estacionalidad.** Los valores de serología deben considerar el comportamiento estacional de cada año. Es decir, siempre es más objetivo comparar los títulos de anticuerpos de primavera con los de primavera, los de otoño con los de otoño, etc. Esto es debido a cambios en los desafíos de campo y también a cambios rutinarios en los programas de vacunación. Por ejemplo, la mayor parte de las empresas avícolas ubicadas fuera de los trópicos reducen considerablemente la presión de vacunación en pollos de engorde durante los meses de verano y otoño.
- c) **Organización cronológica.** Es mucho más fácil examinar el panorama general de una empresa o región observando datos serológicos resumidos en forma gráfica. Esto permite muchas veces observar tendencias que es difícil percibir al analizar datos de lotes de pollos individuales. Por ello debe graficarse toda la

información serológica disponible para obtener un panorama general de la empresa avícola en lugar de concentrarse en lotes o granjas individuales.

- d) **Número de muestras por lote.** En teoría debería decidirse el número de muestras de sueros de acuerdo a la prevalencia esperada de la enfermedad y por supuesto de acuerdo al número de individuos en la población. La experiencia práctica y las restricciones económicas indican que en realidad unas cuantas muestras de suero por lote son suficientes para establecer una base de datos confiable (a excepción de casos específicos de brotes de enfermedad que requieren de un mayor número de muestras). Una práctica común para pollos de engorde es obtener 15 muestras de sueros en el matadero a partir de por lo menos 6 lotes de pollos seleccionados al azar, por ejemplo cada 2 semanas. Este número y la frecuencia de muestreo dependerán de la cantidad de lotes a ser procesados cada semana por empresa. Cuando existan problemas específicos (por ejemplo problemas respiratorios no controlables con medidas convencionales) las muestras deben incluir lotes “problema”, además de los lotes muestreados al azar para poder establecer diferencias. En el caso de abuelas, reproductoras y ponedoras es suficiente obtener por lo menos 15 muestras por lote aproximadamente a las 10, 20, 30, 40 y 60 semanas de edad, con muestreos adicionales en el segundo ciclo de postura si es que se acostumbra pelear o replumar a las ponedoras comerciales. No es aconsejable trabajar con un número reducido de muestras por lote (10 o menos). Si no es posible procesar un número importante de muestras, es mejor incrementar los intervalos entre muestreos para incluir un número adecuado de muestras en cada muestreo.
- e) **Objetivos específicos.** Debe decidirse cuáles enfermedades deben vigilarse siguiendo los objetivos económicos de la empresa. La respuesta a las vacunaciones es importante pero no debe olvidarse que una vez evaluada la respuesta a las vacunas y vacunación deja de ser necesario el muestreo constante y excesivo. Existen algunas enfermedades que generalmente no son nocivas en forma inmediata o directa para las aves pero representan un problema comercial o de salud pública y también es necesario considerarlas en los programas de vigilancia y en diagnóstico.

Creación y mantenimiento de una seroteca. La única manera de evaluar muestras biológicas en forma retrospectiva es mediante el almacenamiento en congelación de muestras de sueros. Existe un número importante de enfermedades poco comunes o exóticas que en ocasiones desearíamos evaluar pero esto no es siempre posible por restricciones económicas o logísticas. El contar con un número limitado pero estratégico de sueros almacenados en congelación (especialmente de reproductoras y abuelas o de lotes de aves con problemas que no ha sido posible aclarar) nos proporciona la posibilidad de eventualmente documentar la seroconversión a ciertas enfermedades. Esto también puede llegar a tener importancia legal en ciertos casos. Si la intención es conservar sueros por períodos prolongados es importante inactivarlos a 57 °C durante 10 minutos antes de congelarlos en tubos herméticamente sellados.

Análisis e interpretación de datos serológicos en función de vacunaciones e infecciones de campo. Es imposible describir en este espacio todos los factores que es necesario considerar en cuanto a interpretación. Algunos de los más importantes se enlistan a continuación:

- a) Las pruebas **ELISA** son muy eficientes en general para detectar tendencias, pero en muchos casos (para muchas enfermedades) no deben usarse como única herramienta diagnóstica.
- b) Debe tomarse en cuenta que las pruebas **ELISA** son en general muy sensibles, y por ello deben confirmarse los resultados “positivos” por otros medios cuando las pruebas ELISA se utilizan como prueba diagnóstica. Tal es el caso de influenza aviar, laringotraqueítis, Pasteurella multocida y lecosis aviar (entre otras).
- c) La **Prueba IH** es de mucha utilidad para evaluar respuestas inmunológicas contra antígenos como el virus de enfermedad de Newcastle o para serotipificar virus de influenza aviar (cuando se cuenta con los antisueros y los antígenos necesarios). En el caso de bronquitis infecciosa la prueba IH sólo debe usarse para orientar el diagnóstico considerando serotipos de virus de bronquitis conocidos, pero nunca debe usarse como única prueba para determinar cuál serotipo (o serotipos) están

involucrados. Es decir, las pruebas ELISA nos indican que existe seroconversión a bronquitis infecciosa y que probablemente se trate de un brote de campo causado por este virus. La prueba IH nos ayuda a orientarnos en cuanto al serotipo involucrado en el brote pero no nos brinda una conclusión final. Los resultados de IH deben interpretarse con especial precaución en aves de vida corta (pollos de engorde) y en situaciones en las que la seroconversión es pobre (títulos bajos). La conclusión diagnóstica debe alcanzarse mediante aislamiento, identificación y caracterización. Esto último se logra usando métodos de seroneutralización viral y/o métodos moleculares. En el caso de bronquitis infecciosa se cuenta con suficientes métodos de laboratorio para aclarar de qué serotipo se trata y por ello no hay excusa para confiar exclusivamente en la serología, y tampoco hay justificación para intentar cambiar de serotipo vacunal (sin la labor diagnóstica completa) con la intención de determinar cuál vacuna funciona mejor contra bronquitis infecciosa en el campo.

- d) La prueba de **inmunodifusión o precipitación en gel de agar (PGA)** es excelente para muchos diferentes tipos de antígenos, pero generalmente no se utiliza más que para determinar si existe o no seroconversión contra algún virus determinado. En general no es una prueba que nos permita diferenciar entre variantes o serotipos. La PGA se utiliza rutinariamente y en forma muy confiable para detección de seroconversión contra virus de influenza aviar del grupo A (todos los virus aviares) pues es muy específica, y en ocasiones también para evaluar la seroconversión contra virus de encéfalomiélitis cuando las pruebas ELISA no proporcionan resultados satisfactorios.
- e) En esta presentación se ilustran diversas aplicaciones de la prueba ELISA en situaciones de campo.

Aplicación de serología en situaciones aplicadas a campo. Las aplicaciones más importantes se enlistan a continuación:

1. Evaluación de la respuesta a la vacunación.
2. Evaluación de la respuesta a diferentes vacunas.

3. Análisis de tendencias como ayuda diagnóstica.
4. Vigilancia epidemiológica para detección de enfermedades poco comunes o exóticas.
5. Investigaciones específicas para determinación de etiologías mediante diagnóstico por exclusión.

1. **Evaluación de la respuesta a la vacunación.** Esta evaluación debe hacerse a edad de matadero en pollos de engorde. En caso de aves de vida prolongada la edad más crítica de evaluación es 6 semanas después de la última aplicación de vacuna inactivada. Para estos objetivos la prueba ELISA es generalmente adecuada y suficiente.
2. **Evaluación de la respuesta a diferentes vacunas.** Si se desea evaluar por ejemplo diferentes vacunas inactivadas se aconseja utilizar pruebas más específicas, incluyendo IH y seroneutralización viral además de ELISA. Es muy importante incluir antígenos residentes pues los kits y antígenos comerciales podrían favorecer algunas vacunas sobre otras, siendo más importante evaluar la respuesta serológica contra antígenos o patógenos residentes en la región de interés. Para incrementar la resolución de estas evaluaciones se aconseja “fraccionar” las vacunas inactivadas. Por ejemplo se pueden vacunar algunas aves experimentales con $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{6}$, o $\frac{1}{8}$ de dosis para determinar cuál vacuna comercial induce mayores títulos de anticuerpos aún después de diluidas las vacunas. No debe olvidarse que cualquier prueba serológica podría evaluar principalmente la cantidad de anticuerpos, pero también la calidad de anticuerpos es fundamental. La calidad de anticuerpos se refiere a la capacidad de los anticuerpos de neutralizar una mayor diversidad de antígenos (serotipos o variantes).
3. **Análisis de tendencias como ayuda diagnóstica.** Para poder analizar tendencias es fundamental contar con datos organizados por edad y cronológicamente. Por ejemplo, cuando se presenta alguna enfermedad respiratoria en el campo la tendencia a una mayor seroconversión (títulos de anticuerpos más altos con frecuencia con menor coeficiente de variación) nos puede orientar para lograr un

diagnóstico más rápido, y nos puede ayudar a excluir posibilidades, pero para ello debe existir una base de datos importante.

4. **Vigilancia epidemiológica para detección de enfermedades poco comunes o exóticas.** El ejemplo clásico es la influenza aviar. Los países o regiones que no cuentan con un sistema de vigilancia para detección de anticuerpos contra influenza aviar son muy vulnerables pues toma tiempo establecer las pruebas serológicas y afinar su desempeño. Muchas veces cuando se llega finalmente a detectar la infección es demasiado tarde pues la enfermedad ya se ha difundido demasiado y es imposible económicamente erradicarla.
5. **Investigaciones específicas para determinación de etiologías mediante diagnóstico por exclusión.** Existen diversos problemas patológicos o síndromes que en ocasiones no es fácil diagnosticar etiológicamente y la serología convencional no es suficiente. Por ejemplo, en los Estados Unidos existen serios problemas ocasionales de proventriculitis. Se han detectado birnavirus, reovirus, adenovirus, etc. en los proventrículos de aves afectadas, pero no se ha podido llegar a un diagnóstico etiológico preciso. Una herramienta de mucha utilidad en nuestro laboratorio ha sido la **inmunofluorescencia directa** para eliminar la posibilidad de infección del proventrículo con ciertos antígenos virales (virus de Gumboro y reovirus). También hemos utilizado la prueba ELISA para captura de antígeno (AC-ELISA) de virus de Gumboro en la bolsa de Fabricio y en el proventrículo. Nuestros datos recientes de AC-ELISA sugieren que la proventriculitis degenerativa que observamos con mucha frecuencia no es causada directamente por virus de Gumboro (y posiblemente tampoco por reovirus, pero probablemente se encuentre involucrado algún adenovirus). Sin embargo, esta misma prueba nos ha sido muy útil para detectar y clasificar rápidamente los virus de Gumboro encontrados en la bolsa de Fabricio a partir de macerados de bolsas de Fabricio. Por otra parte, nuestro laboratorio utiliza en forma rutinaria la **inmunofluorescencia directa** para detección de virus de bronquitis infecciosa y de laringotraqueítis infecciosa a partir de tejidos del aparato respiratorio superior. La detección oportuna y precisa de virus de laringotraqueítis infecciosa (LTI) ha permitido la contención casi inmediata de brotes de LTI en el estado de Georgia.

Los anteriores son sólo algunos ejemplos de aplicaciones en investigaciones de campo, pero existen muchas otras posibilidades a través de la serología.

En esta presentación se describe además una base de datos serológicos para el estado de Georgia en los Estados Unidos y se coteja con una descripción de los programas de vacunación utilizados más comúnmente en pollos de engorde, reproductoras pesadas y ponedoras.