

VALIDACIÓN DE UNA PRUEBA DE ELISA CUANTITATIVA PARA EL DIAGNÓSTICO Y MONITOREO DE LA VACUNACIÓN CONTRA INFLUENZA AVIAR EN MEXICO

Bautista, B (1); Barron L. (1); Lucio E. D. (1); Sayd S. (2); Muñoz R. (2); Shoberg R (2); Manfredini M (2); Anda, M (3); Mercado. M. (3)

(1) Investigación Aplicada

7 Norte No. 416. Tehuacán, Puebla

Tel: 01 238 38 03812 www.iasa.com

(2) Idexx Laboratorios

One Idexx Drive, Westbrook ME 04092

Tel: 207. 8560300; www.idexx.com

(3) CENASA – México

Km. 37.5 Carretera Federal México Pachuca, Tecamac Edo. Mex.

01 55 59 34 66 22

Resumen

Actualmente se considera el método de Inhibición de Hemaglutinación (HI) la prueba oficial en México para diagnóstico serológico de Influenza Aviar (IA). La ventaja de esta prueba es la alta sensibilidad, lo que permite un diagnóstico temprano y también el monitoreo de animales vacunados. La desventaja del HI es que es una prueba subtipo específico, además de la variabilidad en la técnica y los falsos positivos para los títulos bajos. A pesar de que el Programa Nacional de mejoramiento avícola (NPIP) de los Estados Unidos de Norteamérica reconozca la ELISA como una prueba oficial para ese país, en México existe inquietud con respecto a la interpretación de los resultados de animales vacunados y también se considera una baja sensibilidad de esta técnica comparándose con HI. En este estudio hecho en México, en colaboración con el CENASA, 412 muestras de suero de aves fueron analizadas en HI, Elisa y Agar Gel Precipitación (AGID), que es la prueba recomendada por la Oficina Internacional de Epizootiologías (OIE). Los resultados de ELISA fueron calculados en títulos a través del software xChek para facilitar la interpretación. La sensibilidad del Elisa comparada con el HI fue entre 96.3-100%. La especificidad del Elisa comparada con el HI fue 99.5%. La correlación entre los métodos ELISA IDEXX y HI fue de 98.3%, valor kappa 0.97. La línea base obtenida en reproductoras vacunadas con vacunas inactivas fue entre 3000-10000 (Titulo Geométrico) y coeficiente de variación de 40 –50%. En pollos de engorde vacunado con vacunas inactivas se obtuvo título geométrico entre 5000-6000 y coeficiente de variación menor que 40%. Se consideramos que no hay síntomas patognomónicos de IA y que la detección precoz de cualquiera subtipo de IA es una ventaja para el programa de control, juntamente con los resultados de este estudio, la técnica de ELISA surge como una importante opción de diagnóstico serológico.

Introducción

La Influenza Aviar es considerada como una enfermedad de gran importancia económica para la industria avícola. El agente causal de la enfermedad es el virus de Influenza A, que pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*. La infección en las aves puede presentar un amplio rango de signos clínicos. Dependiendo de la edad, tipo de ave y condiciones ambientales, una cepa altamente patógena puede causar desde muerte súbita con poco o ningún signo clínico hasta presentar signos respiratorios como lagrimea excesivo, sinusitis, edema de cabeza, cianosis y diarrea. Mientras todas las cepas virulentas que producen casos clínicos agudos en gallinas y pavos pertenecen al subtipo H5 o H7, la mayoría de los aislados H5 y H7 son de baja virulencia. No hay síntomas patognomónicos. Por eso es necesario que se haga un diagnóstico de laboratorio. La serología para Influenza aviar es una herramienta muy valiosa en los programas de vigilancia epidemiológica. La serología indica si hay presencia de anticuerpos en un lote de aves. Estas aves entonces tienen que ser enviadas al laboratorio oficial de referencia para aislamiento, caracterización y demostración de virulencia. La brotes de Influenza Aviar altamente patógeno (HPAI – Highly Pathogenic Avian Influenza) deben ser comunicados a la OIE. Uno de los cambios propuestos para la actualización del Manual de OIE es que el término HPAI sea sustituido por la notificación de IA y la infección causada por H5 y H7.

Actualmente se considera el método de Inhibición de Hemaglutinación (HI) la prueba oficial en México para diagnóstico serológico de Influenza Aviar. La ventaja de esta prueba es la alta sensibilidad, lo que

permite un diagnóstico precoz y también el monitoreo de animales vacunados. La desventaja del HI es que es una prueba subtipo específico. Los subtipos de IA son formados por antígenos de 15 hemaglutininas (H1-H15) y 9 neuraminidasas (N1-N9). La Inhibición de hemoaglutinación detecta anticuerpos para la hemaglutinina del virus, por lo tanto puede no detectar infección con otro subtipo que no sea el empleado como antígeno en la prueba. Otro problema relacionado con el HI es la inconsistencia de resultados dado la subjetividad de la prueba y variabilidad en la técnica. Los falsos positivos para los títulos bajos (1:10 y 1:20), el dispendioso tiempo y el trabajo para realizar la prueba son desventajas constantemente referidas principalmente cuando se tienen que procesar un gran número de muestras.

Exactamente para solucionar estos problemas es que se desarrolló la técnica de Elisa. Esta prueba fue introducida comercialmente en los fines de los años 90 y ha sido ampliamente utilizada en todo el mundo, debido a las innumerables ventajas. En primer lugar porque la ELISA detecta todos los subtipos de Influenza aviar, siendo por tanto una excelente opción para vigilancia epidemiológica y pruebas de rutina para escrutinio. Es una prueba de alta sensibilidad, rápida, estandarizada y permite que se procesen muchas muestras al día, además de la disponibilidad de reactivos.

A pesar de que el USDA reconozca la ELISA como una prueba oficial en Estados Unidos, en México hay la inquietud con respecto a la interpretación de los resultados de animales vacunados y también se considera una baja sensibilidad de esta técnica comparándose con HI.

La prueba de referencia de OIE para serología es el Agar Gel Inmunodifusión (AGID). Esta prueba detecta anticuerpos para antígenos del nucleocápside y/o matriz del virus. Todos los virus influenza A tienen nucleocápside antigénicamente similar y antígenos de proteínas de la matriz antigénicamente similares. Por lo tanto la prueba de AGID es capaz de detectar anticuerpos contra cualquier subtipo de virus de influenza. Pero hay que considerar que existen aves que no son capaces de producir anticuerpos precipitantes.

El objetivo de este estudio es analizar muestras de reproductoras y pollos de engorde de acuerdo con el Programa Nacional de Control de IA en México a través de las técnicas de Elisa, HI y AGID y determinar la sensibilidad relativa, la especificidad relativa, la correlación total, la interpretación de resultados en aves vacunadas y proponer una línea base para aves vacunadas.

Material y Métodos

Sueros : Un total de 412 muestras de sueros de aves fueron usados para este estudio, de acuerdo a los grupos a seguir:

- 1 – Aves libres de infección y no vacunadas: 184 muestras de suero
- 2 - Pollos de engorde en edad de sacrificio, vacunados a los 11 días de edad con vacuna oleosa: 23 muestras de lotes de 38 días, 41 días y 47 días de edad (total de 67 muestras)
- 3 – Reproductoras vacunadas a las 8 y 16 semanas con vacuna inactivada oleosa: 23 muestras de lotes con 22, 45, 50, 58 y 62 semanas (total de 161 muestras).

Prueba de HI: 25 μ l de sueros diluidos 1:5 fueron colocados en placas de fondo “U”. 5 diluciones dobles seriadas fueron hechas se transfirió 25 μ l de la fila A a la B y así sucesivamente. A cada pozo se adicionó 25 μ l del antígeno con 4 UHA, se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y se agregó 50 μ l de una suspensión de glóbulos rojos al 0.5%. Se leyó después de una incubación a temperatura ambiente por 30 minutos. Se consideró positivo los sueros con título igual o superior a 10.

Prueba de AGID: 25 μ l de sueros fueron adicionados en pocillos, de acuerdo a las manecillas del reloj, sin tomar en cuenta el pocillo superior y la central. 25 μ l de antígeno específico (4 UH)^{Charles River} fue adicionado en el pocillo central y de 25 μ l de antisuero positivo^{Charles River} en el pocillo superior. Se leyó después de la incubación a temperatura ambiente en cámara húmeda por 48 h.

Prueba de ELISA: Se utilizó el kit de ELISA comercial de IDEXX Laboratorios, Inc. de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La prueba fue realizada en microplacas de poliestireno de 96 orificios revestidas con antígeno viral de IA. Las muestras probadas fueron diluidas 1:500 en diluyente específico y adicionadas a la placa para de incubación de 30 minutos. Se realizó un lavado y se agregó 100 μ l de conjugado enzimático anti-pollo/anti-pavo para nueva incubación de 30 minutos. Se lavó la placa nuevamente para la remoción del conjugado que no reaccionó y se agregó 100 μ l de substrato cromógeno y en 15 minutos se agregó la solución de parada. Se leyó la placa en un lector de Elisa con filtro de 650nm.

Las Densidad Óptica (OD) fueron enviadas automáticamente de la lectora a la computadora a través del software xChek. Este software calculó la razón S/P (razón entre densidad óptica de la muestra y el control positivo) y la nota de corte de la prueba:

$$\text{Razón S/P} = \frac{\text{OD muestra (Sample)} - \text{OD Control Negativo}}{\text{OD Control Positivo} - \text{OD control Negativo}}$$

Nota de corte para IA:

1. Muestra con razón S/P mayor que 0.5 es positiva
2. Muestra con razón S/P menor o igual a 0.5 es negativa

Para este estudio se calculó también el título correspondiente a la razón S/P a través de la siguiente ecuación:

$$\text{Log}_{10} \text{ Título} = 1.09 (\text{Log}_{10} \text{ S/P}) + 3.36$$

Los títulos fueron agrupados en 18 grupos para ser consistente con los demás kits y facilitar el entendimiento y la interpretación de los resultados para los veterinarios (Tabla 1). Títulos encima de 1077 son considerados positivos

Especificidad : La especificidad de una prueba es la medida de su capacidad de detectar verdaderos negativos. Por lo tanto debe ser calculada sobre muestras caracterizadamente negativas. En esto estudio se utilizó las aves libres de IA sin vacunación, calculándose la probabilidad de concordancia entre el Elisa y HI y entre el HI y el AGID.

Sensibilidad: La sensibilidad de una prueba es la medida de su capacidad de detectar verdaderos positivos. Por lo tanto debe ser calculada sobre muestras caracterizadamente positivas. En esto estudio se utilizó los pollos de engorde y en las reproductoras vacunadas, calculándose la probabilidad de concordancia entre el Elisa y HI y entre el HI y el AGID.

Concordancia total: La concordancia total de los resultados positivos y negativos fue calculada de acuerdo con la probabilidad de concordancia observada entre el Elisa y el HI y el valor kappa (Tabla 2).

Monitoreo de vacunación: La interpretación de los resultados y la línea base fue sugerida basada en la comparación de los resultados de HI y Elisa.

Estadísticas: Fueron utilizados cálculos de análisis de concordancia para determinación de la sensibilidad, especificidad, concordancia total entre 2 métodos y el valor kappa. La Media Geométrica, Media Aritmética y Coeficiente de Variación fueron calculados para interpretación de los resultados.

Resultados

Especificidad: 183 muestras entre 184 muestras fueron negativas en el Elisa y HI, lo que corresponde a 99.5% de especificidad. 100% de las muestras fueron negativas en el AGID. La media geométrica de la razón S/P(GMT) de las muestras negativas en el Elisa fue 0.032, valor bien distante de la nota de corte que es 0.5.

Sensibilidad : Todas las 67 muestras de pollos de engorde vacunados fueron positivas en el Elisa y HI, lo que corresponde a 100% de sensibilidad. La media geométrica de la razón S/P fue de 2.968, valor mucho superior a la nota de corte del kit que es 0.5. El AGID detectó 53 positivos de los 67, indicando una sensibilidad relativa de 79.1%. En las reproductoras vacunadas, el Elisa detectó 155 positivas entre 161 muestras. La sensibilidad relativa fue de 96.3%. Las 6 muestras negativas en la ELISA también fueron negativas en el AGID. El AGID detectó 81 positivos y 80 negativos, con una sensibilidad relativa a lo HI de 50.3%.

Concordancia total: De las 412 muestras analizadas, 222 fueron positivas y 183 fueron negativas por el HI y ELISA. La ELISA detecto 1 falso positivo y 6 falsos negativos teniendo el HI como referencia. La concordancia total entre las dos técnicas fue de 98.3% y un valor kappa de 0.966. La kappa entre 0.81-1.00 indica concordancia case perfecta.

Monitoreo de vacunación: La tabla 2 presenta los resultados de los títulos de HI y ELISA. Pollos de engorde presentaron HI GMT entre 57 y 219 con CV % de 107-128% y la ELISA GMT entre 4584-6259 con un %CV de 32-48%. Reproductoras vacunadas presentaron HI GMT entre 292-650 con %CV de 43-79% y la ELISA GMT 2878-8852 con un %CV 22-61%. El histórico del comportamiento de los anticuerpos a lo largo del tiempo medido en Media Aritmética presentó 74% de correlación entre las 2 técnicas (gráfica 1)

Discusión:

De acuerdo a este estudio la ELISA tiene alta especificidad relativa (99.5%), alta sensibilidad relativa (96.3-100%) y excelente concordancia con el HI. El monitoreo de animales vacunados sugiere que en pollos de engorde se encuentre títulos entre 5000 a 6000 con CV de 30-40% y que reproductoras presenten títulos entre 3000-10000 con CV de 40-50%. Otra ventaja del Elisa es que la interpretación de los resultados de animales vacunados es facilitada por los histogramas y las estadísticas son hechas automáticamente a través del software. Las líneas base pueden ser rápidamente calculadas y pueden adaptarse a las características y objetivos de cada empresa.

Estos datos permiten sugerir que la ELISA sea reconocido como una herramienta opcional de serología dentro del Programa Nacional de control de IA en México, contribuyendo de esta manera para la detección rápida y segura de todos los subtipos del virus, con excelente sensibilidad y con líneas base para el monitoreo de vacunación.

Tabla 1: Títulos y grupos de título del kit de Elisa IDEXX.

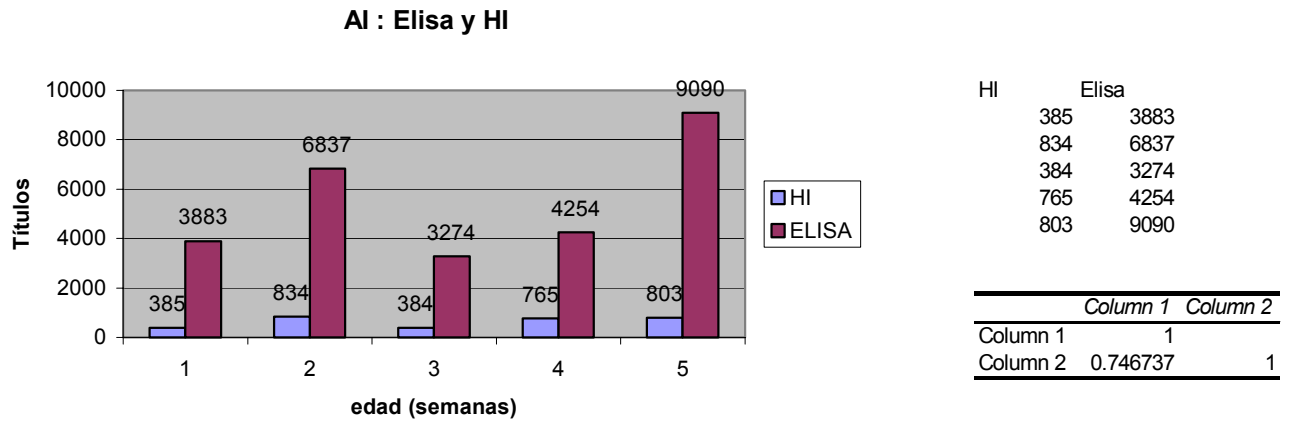
| Grupo | Título | Interpretación | Grupo | Título | Interpretación |
|-------|--------|----------------|-------|--------|----------------|
| 0 | 0-1076 | Negativo | 10 | 12000 | Positivo |
| 1 | 1077 | Positivo | 11 | 14000 | Positivo |
| 2 | 1500 | Positivo | 12 | 16000 | Positivo |
| 3 | 2000 | Positivo | 13 | 18000 | Positivo |
| 4 | 3000 | Positivo | 14 | 20000 | Positivo |
| 5 | 4000 | Positivo | 15 | 22000 | Positivo |
| 6 | 5000 | Positivo | 16 | 24000 | Positivo |
| 7 | 6000 | Positivo | 17 | 28000 | Positivo |
| 8 | 8000 | Positivo | 18 | 32000 | Positivo |
| 9 | 10000 | Positivo | | | |

Tabla 2: Monitoreo de vacunación a través de HI y Elisa en pollos de engorde vacunados a los 11 días de edad y reproductoras vacunadas a las 8 y 16 semanas con vacunas oleosas.

| Tipo de animal y edad | HI | | | ELISA | | |
|-------------------------|-----|-----|-------|-------|------|-------|
| | AMT | GMT | CV(%) | AMT | GMT | CV(%) |
| Engorde 38 días | 376 | 219 | 107 | 5861 | 5426 | 35.9 |
| Engorde 41 días | 200 | 62 | 184 | 6616 | 6259 | 32.1 |
| Engorde 47 días | 113 | 57 | 128 | 5227 | 4584 | 48.4 |
| Reproductora 22 semanas | 385 | 351 | 43.7 | 3883 | 3426 | 44.9 |
| Reproductora 45 semanas | 834 | 650 | 79.1 | 6833 | 5936 | 43 |
| Reproductora 50 semanas | 384 | 292 | 73 | 3274 | 2878 | 44 |
| Reproductora 58 semanas | 765 | 523 | 68.4 | 4254 | 3496 | 61 |
| Reproductora 62 semanas | 803 | 567 | 65.4 | 9090 | 8852 | 22.5 |

AMT: Media Aritmética; GMT: Media Geométrica; %CV: Coeficiente de Variación en porcentaje

Gráfica 1: Histórico de los anticuerpos a lo largo del tiempo en reproductoras vacunadas medidos a través de Media Aritmética de los títulos de HI y Elisa y la Correlación entre las medias aritméticas del HI y Elisa



1=22 semanas; 2=45 semanas;3=50 semanas;4=58 semanas; 5=62 semanas

Referencias Bibliográficas

Manual of Standards for diagnostic tests and Vaccines, 2000: Office International des Epizooties. World Organizationfor Animal Heath