

Algunas consideraciones para interpretar resultados serológico.

MVZ. Jorge Alberto Escamilla Juárez

escamillaj.lcdp@gmail.com

Laboratorio Cordobés de Diagnóstico Pecuarios S.C.

Introducción:

El impacto económico que ha sufrido la Industria Avícola Mexicana a causa de la recesión económica mundial ha ocasionado que todos los sectores productivos avícolas sean más eficientes, competitivos y analíticos en la toma de decisiones. La modernización en la industria, aunada a los avances logrados en la genética de las aves han modificado la fisiología, el desarrollo muscular de las aves y los sistemas de manejo. Además los agentes infecciosos han evolucionado como acto de sobrevivencia, apareciendo mutaciones, variaciones y nuevos agentes ocasionando modificaciones en la presentación de las enfermedades. Esta serie de factores o cambios impactan económicamente a la avicultura por las pérdidas ocasionadas en la presentación de la enfermedad como tal y por las acciones aplicadas para la solución del problema.

El papel del Laboratorio de Diagnóstico debe tener un sistema integral, que nos permita monitorear las enfermedades aviares y como consecuencia la vigilancia de la salud animal, vigilar los sistemas de producción como manejo, bioseguridad y calendarios de vacunación, de manera que los resultados sean confiables, precisos y oportunos.

La serología forma parte de este sistema integral de diagnóstico y es una herramienta fundamental para implementar y evaluar los programas de medicina preventiva, además de monitorear la ausencia o exposición de las enfermedades. Los datos obtenidos por este sistema deben ser comparados frecuentemente para que sea una herramienta dinámica (crear un historial), que nos muestre los cambios de situación sanitaria en la granja, a modo que permita dar un seguimiento inmunológico del calendario de vacunación. El uso constante de las pruebas serológicas nos permite, crear un historial para establecer los parámetros esperados de acuerdo a la edad, estación del año y fin zootécnico, determinar e interpretar más fácil y preciso las variaciones observadas por cambios en el calendario de vacunación o por la exposición de agentes infecciosos de campo. Es muy importante considerar que la interpretación de un solo grupo de resultados nos puede conducir a conclusiones errónea.

El objetivo del presente trabajo es considerar todos los factores que intervienen en la interpretación de resultados serológicos.

Bases de Inmunología en Pollos

La palabra inmunidad proviene del Latín "Immunitas", éste termino fue aplicado desde el siglo V a.C. en el imperio romano por los senadores ya que contaban con la protección total y absoluta del emperador. Aplicando el concepto al sistema inmune, su función principal es proteger a los animales contra agentes infecciosos, los cuales pueden ser virus, bacterias y parásitos. El sistema inmune recurre a una serie de mecanismos complejos que interactúan de manera armónica para desarrollar su función. Para fines prácticos se divide en Inmunidad Inespecífica o innata e Inmunidad específica.

Inmunidad Inespecífica o Innata:

Esta inmunidad se encuentra en los seres vivos desde el momento del nacimiento, es la primera barrera de defensa **no específica** del organismo frente a las infecciones. En primera instancia están las barreras físicas constituida por la piel y mucosas, su integridad es importante para evitar la invasión de agentes patógenos. Barreras fisiológicas como la temperatura y pH. Barreras químicas constituida por lisozima, enzimas mucolíticas, ácido del estómago, proteínas sanguíneas como el complemento y mediadores de la inflamación. La fangocitosis es otro mecanismo de defensa inespecífico

realizado por neutrófilos, macrófagos y células asesinas naturales (NK). Esta respuesta, se desencadena a los pocos minutos u horas de que el animal sufrió la agresión; cuando ésta primera barrera falla, se establece la infección y comienza a desarrollarse la inmunidad adquirida.

Inmunidad Específica o Adquirida:

Es el resultado de la respuesta inmune frente a una molécula o agente extraño para el animal (**antígeno**). Se genera una respuesta específica y especializada contra el antígeno, además tiene memoria, lo que le da la capacidad de responder de manera más rápida en exposiciones repetidas del mismo microorganismo. Esta inmunidad se divide en celular y humoral.

Inmunidad Celular: Se caracteriza por la activación y proliferación de linfocitos T, estos se desarrollan en la médula ósea a partir de las células pluripotenciales, posteriormente migran al timo para su maduración. Esta respuesta inmune se da principalmente por los linfocitos T CD8 y T CD4.

Células T CD8 Citotóxico; se une a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase I. Su acción principal es contra antígenos intracelulares como virus (células Diana), bacterias, protozoarios intracelulares y células tumorales. Una vez activadas estas células desarrollan la capacidad de perforar de las células infectadas y frenar de esta manera la propagación del agente infeccioso.

Células T CD4 Cooperadores; se une a moléculas del CMH clase II que tiene en su superficie las células presentadoras de antígeno, al unirse, activa la proliferación y diferenciación de los linfocitos T y B. Su acción principal es interactuar con los macrófagos y células presentadoras de antígeno para desencadenar la respuesta inmune. Ejemplo bacterias y protozoarios extracelulares.

Inmunidad Humoral: Se caracteriza por la proliferación y diferenciación de los linfocitos B en la bolsa de Fabricio. Los linfocitos B, al ser estimulados por la presencia de un antígeno (Ag), activan su proliferación y diferenciación a células plasmáticas y a linfocitos B de memoria. Las células plasmáticas sintetizan y liberan al exterior grandes cantidades de inmunoglobulinas (Ig) o anticuerpos (Ac) específicas hacia un antígeno en particular. Los anticuerpos son muy efectivos para neutralizar toxina y virus; su efectividad se ve disminuida contra bacterias, protozoarios y células infectadas, para ello necesitan de la acción del sistema del complemento, macrófagos, linfocitos T citotóxicos y células cebadas. La formación de Ac provocada tras el primer contacto de un Ag con el linfocito B se llama respuesta primaria. Este primer contacto confiere al ave una memoria inmunológica, de forma que el sistema se encuentra preparado para afrontar una segunda infección por el mismo agente. En la respuesta secundaria la formación de Ac es más rápida y más intensa, ello se debe a que a partir del linfocito primario que tuvo el primer contacto con el Ag, se generó en paralelo una células B de memoria aparte de las células plasmáticas.

Dentro de las inmunoglobulinas que se generan, la **IgA** se encuentra principalmente en secreciones del tejido epitelial (sistema respiratorio, digestivo, genitourinario); la **IgM** es la primera inmunoglobulina en producirse tras una respuesta inmune y es el predominante en la respuesta primaria; la **IgG** se encuentra en mayor cantidad en el suero y es el mayor mecanismo de defensa contra las infecciones sistémicas, es el anticuerpo más importante en la respuesta secundaria. En serología la principal inmunoglobulina que se monitorea es la IgG y en un menor grado la IgM.

Consideraciones a tomar en cuenta para la Interpretación de los Resultados Serológicos.

Las pruebas de serología nos ayudan a detectar o monitorear la inmunidad humoral, usualmente los anticuerpos se detectan en muestras de suero sanguíneo y eventualmente se ha utilizado para detectar anticuerpos en yema de huevo o en otros

fluidos corporales. Con las pruebas serológicas podemos monitorear: la inmunidad pasiva (anticuerpos maternos), los calendarios de vacunación, exposición de agentes infecciosos en particular, enfermedades que se encuentren en campaña nacional. Para interpretar los resultados obtenidos debemos de tomar en cuenta los siguientes factores que pueden afectar los resultados.

Factores que se asocian a la Muestra: El error más frecuente consiste en refrigerar o congelar la muestra de sangre antes de que se presente la coagulación, esto ocasiona que la muestra presente hemólisis la cual interfiere con las pruebas serológicas. El suero que presente contaminación por una mala conservación o almacenamiento también interfiere con las pruebas. Enviar los sueros en recipientes sin cierre hermético ocasiona que se derrame la muestra o se contamine, además se debe de tomar en cuenta el volumen de la muestra cuando se soliciten realizar varias pruebas a la misma. El número de muestras para un monitoreo es muy importante, con 10 muestras por caseta es adecuado para realizar el estudio. Un solo muestreo no es suficiente para emitir un diagnóstico, se requieren por lo menos de dos muestreos con 3 semanas de diferencia entre ellos.

Factores que se asocian a la Prueba: Puede haber diferencia entre el antígeno utilizado en la prueba y el antígeno utilizado para la inmunización de las aves. Los reactivos utilizados tienen limitado tiempo de caducidad. Ninguna prueba tiene el 100 % de sensibilidad y especificidad. La temperatura ambiental que hay al momento de realizar la prueba afecta en los resultados. Utilizar material nuevo o reutilizado como puntas o microplacas. Mantener los equipos calibrados. Los resultados obtenidos no nos diferencian si son por infección de campo o por vacunación.

Factores que se asocian al Técnico: Por su naturaleza el humano tiende a cometer más errores que las máquinas. Algunos resultados son subjetivos y la interpretación puede ser diferente entre técnicos.

En la toma de decisiones el Profesionalista de campo además de tomar en cuenta los factores anteriores debe de tomar en cuenta los siguientes aspectos: función zootécnica de la parvada, edad de las aves, calendario de vacunación, número de dosis y vías de aplicación de vacunas y el apoyo o uso de otras pruebas de diagnóstico (bacteriología, virología, histopatología, etc).

Pruebas serológicas más utilizadas.

Hay pruebas cualitativas y cuantitativas; las pruebas cualitativas solo nos indican si el resultado es positivo y negativo. Con las pruebas de tipo cuantitativo podemos determinar los niveles de anticuerpos que hay en el suero ya que se realizan diluciones seriadas del suero.

Aglutinación Rápida en Placa (ARP): El fundamento se basa en la formación de grumos por la unión del antígeno a los anticuerpos. Es una prueba rápida, cualitativa, de aglutinación macroscópica, que se realiza con una sola dilución y detecta anticuerpos IgG e IgM. El resultado es positivo o negativo.

Precipitación en Gel de Agar (PGA): El fundamento se basa en la migración concurrente de un antígeno y un anticuerpo a través de una matriz de gel de agar, cuando el antígeno y los anticuerpos se ponen en contacto se combinan, formando líneas de precipitación. Es una prueba cualitativa, muy específica y detecta anticuerpos IgG. El resultado es positivo o negativo.

Inhibición de la Hemoaglutinación (IH): El fundamento se basa en que los anticuerpos inhiben la hemoaglutinación viral. Es una prueba rápida, sencilla y cuantitativa ya que puede medir los niveles de anticuerpos en la muestra al realizar diluciones dobles seriadas; los anticuerpos detectados son IgG e IgM.

Virus Suero Neutralización (VSN): El fundamento se basa en la capacidad que tienen los anticuerpos para unirse al antígeno e incapacitarlo para infectar. Es una prueba costosa, necesita personal capacitado, es altamente específica y cuantitativa ya que puede medir los niveles de anticuerpos en la muestra al realizar diluciones dobles seriadas; los anticuerpos detectados son IgG e IgM.

Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima (ELISA): El fundamento se basa en una reacción inmunoenzimática, se utiliza un antisuero marcado con una enzima y el resultado se basa en una reacción colorimétrica que es medida por un espectrofotómetro. Es una prueba muy sensible, rápida, barata, el suero se diluye una sola vez y la intensidad del color que se observa en la prueba es proporcional al nivel de anticuerpos de la muestra. Además los resultados se clasifican en grupos o perfiles en un histograma. Es muy importante analizar el comportamiento de los sueros dentro del histograma, la media geométrica, valores máximos y mínimos y el coeficiente de variación ya que nos proyecta la uniformidad de los resultados. Se detectan anticuerpos IgG e IgM.

El resultado obtenido en las pruebas de Inhibición de la Hemoaglutinación y Virus Suero Neutralización se expresa como el título de la muestra que indica la dilución mayor en la que existe reacción positiva: ejemplo **1:64** o su inverso **64**, también se puede expresar el Logaritmo base 2 ($\text{Log}_2 64$).

Posibles Resultados Serológicos

Los resultados que a continuación se presentan son una guía de lo que podemos esperar en producción avícola, no es la verdad absoluta, puede haber variaciones por el tipo de vacuna utilizadas (emulsionada, virus vivo, recombinante, etc), la inmunogenicidad de la cepa utilizada, el calendario de vacunación y el estado inmunológico de las aves.

Enfermedad de Newcastle: Se utiliza con mayor frecuencia la prueba de IH, la presencia de anticuerpos maternos en pollitos de un día de edad nos indican protección. En pollo de engorda con vacunación simultánea, se esperan títulos de 1:32 a 1:512 a las 5 semanas de edad. En aves de postura o reproductoras con vacuna emulsionada y 2 o 3 vacunas a virus vivo se esperan títulos de 1:32 a 1:2048. Títulos menores a 1:16 indica susceptibilidad de las aves a presentar la enfermedad, aunque se han reportado aves protegidas al desafío, aún con títulos de 1:8.

Por la Prueba de ELISA, títulos de 0 a 397 son muestras negativas.

Bronquitis Infecciosa: La prueba más utilizada es la ELISA, la presencia de anticuerpos maternos en pollitos de un día de edad indican protección. Pollos de engorda con un vacuna de virus vivo se esperan títulos de 500 a 2500. Aves de postura o reproductoras con 2 o 3 virus vivos se pueden obtener títulos de 10,000 o mayores.

Con la prueba de IH se pueden obtener resultados confusos ya que hay reacción cruzada entre los serotipos, títulos menores a 1:40 son negativos, en aves con 2 o 3 vacunas a virus vivos se pueden tener títulos de 1:640 a 1:2560; con vacuna emulsionada puede llegar a 1:10,240.

Con la prueba de VSN en aves con 3 virus vivos se esperan títulos entre 1:160 a 1:1280, con vacuna emulsionada se pueden tener títulos de 1:10,240.

Infección de la Bolsa de Fabricio: La prueba más utilizada es la ELISA, anticuerpos maternos en pollitos de un día indican protección. En pollo de engorda con 1 a 2 vacunas a virus viro se esperan títulos entre 500 a 2500 a las 5 semanas de edad. En aves con vacunas emulsionadas se pueden tener títulos entre 5000 a 20,000.

Con la prueba de VSN, títulos de 1:40 o menos son negativos; aves vacunadas con virus activo se pueden esperar títulos entre 1:160 y 1:1280. Aves con vacunas emulsionadas puede haber títulos entre 1:5120 y 1:20,480.

Influenza Aviar: La prueba más utilizada es la IH, títulos menores o iguales a 1:4 son negativos, títulos de 1:8 es sospechoso y títulos iguales o mayores a 1:16 son positivos.

Micoplasmosis: Se utiliza la prueba de ARP, es una prueba cualitativa, cuando de una muestra se obtiene un resultado positivo, se deben pasar a otra prueba para confirmar su positividad; frecuentemente se utiliza la prueba de IH. Por IH títulos menores a 1:40 son negativos, títulos de 1:40 son sospechosos y títulos iguales o mayores a 1:80 son positivos.

Por la prueba de ELISA, títulos de 0 a 1077 son negativos.

Obtener títulos positivos en pollitos de un día de edad indican infección o vacunación en reproductoras y posible transmisión del *Mycoplasma* en la progenie.

Reovirus: La prueba más utilizada es la ELISA, títulos de 0 a 397 son negativos. La presencia de anticuerpos en pollitos de un día de edad indican protección. En pollo de engorda donde no es común la vacunación, se esperan títulos negativos a partir de la tercera semana de edad. En aves reproductoras o postura con una vacuna emulsionada puede haber títulos entre 2000 a 7500.

Anemia Infecciosa: Para esta enfermedad se usa normalmente la prueba de ELISA de competencia, donde la cantidad de anticuerpos es inversamente proporcional a la intensidad de la reacción colorimétrica. Resultados altos indican ausencia de anticuerpos y lecturas bajas su presencia. La prueba se puede hacer de dos formas: la primera diluyendo la muestra de suero 1:10, solo nos indica si la muestra es positiva o negativa (S/N mayor a 0.6 es negativo, S/N menor o igual a 0.6 es positivo); la segunda es diluyendo la muestra 1:100, en la que se obtiene el título de la muestra, títulos menores a 1000 son negativos y títulos iguales o mayores a 1000 son positivos.

Síndrome de Baja de Postura: Se utiliza con mayor frecuencia la IH, títulos menores o iguales a 1:40 son negativos, con vacuna emulsionada se pueden esperar títulos entre 1:80 a 1:640; títulos mayores a 1:640 podría indicarnos una exposición al virus de campo.

Encefalomiелitis Aviar: Se utiliza la prueba de ELISA, en aves de postura y reproductoras se pueden esperar títulos superiores a 2000 para transferir una buena inmunidad pasiva a su progenie.

Bibliografía:

Lucio, M.B. Sistema Inmune e Inmunodepresión en las Aves. Memorias del XX Curso Avimex de Salud y Productividad. Actualidades en Vacunología Aviar. México D.F. Junio 27, 2008.

Muñoz, R. y Sayd, S. Importancia de la Herramientas de Diagnóstico en las Enfermedades Aviares. XII Jornadas Médico Avícolas. FMVZ-UNAM. 2006

Pérez, M. V. Aplicación de Algunos Métodos Serológicos en la Industria Avícola. Investigación Aplicada, S.A.

Soto, P.E., Murillo, M y Martínez, J.L. Criterios Utilizados en la Interpretación de los Resultados de Pruebas Serológicas en las Aves. 7º Jornada Médico Avícola. FMVZ-UNAM. 1998.

Swayne, D., Glisson, J., Jackwood, M, Pearson, J. and Reed, W. A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens. American Association of Avian Pathologist, Inc. Fourth Edition. Kennett Square, Pennsylvania, 1998.

Valladares, C.J. Perpectivas de Diagnóstico en Aves. XV Jornada Médico Avícola. FMVZ-UNAM.2009.