

Interpretación y uso de exámenes de ELISA en Avicultura (Interpretation and use of elisa test in poultry)

Dr. Christian Vineza MV.

Integración avícola Oro. Domingo Juan N63-93 y Sabanilla,
Quito Norte (Quito - Ecuador)

Contacto:

<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/curriculum/crisvinu>



RESUMEN

Una de las herramientas más importantes para el control serológico en avicultura es la prueba de ELISA (enzim linked inmuno sample assay). Este examen es ampliamente utilizado en la práctica de la medicina humana y veterinaria ya que puede identificar partículas inherentes al sistema inmune en acción: los anticuerpos y los antígenos. En este contexto es necesario saber interpretar las pruebas utilizando todos los datos que se ponen a nuestra disposición para poder ser certeros en el tratamiento y control de enfermedades así como para poder planificar y monitorear los esquemas de vacunación que implementamos en nuestras granjas teniendo en cuenta que los resultados de laboratorio siempre deberán ser confrontados con los resultados productivos que obtengamos. El presente trabajo se refiere a la interpretación de los histogramas generados mediante la prueba de ELISA y los usos que se le puede dar a esta información.

Palabras clave: ELISA, avicultura, histograma, línea base

SUMMARY

One of the most important tools for serologic control in poultry is the ELISA test. This test is widely used in human and veterinary medicine practice. It is able to identify immune system particles: both antibodies and antigens. It is crucial the "know-how" to interpret the test using all data at our disposal. This will secure an

effective control and treatment of diseases as well as an adequate planning and monitoring of vaccination programs. It is important to compare laboratory's results with the productive standards. This work is about histogram interpretation generated by the ELISA test and its different uses.

Keywords: ELISA, poultry, histogram, base line.

INTRODUCCIÓN

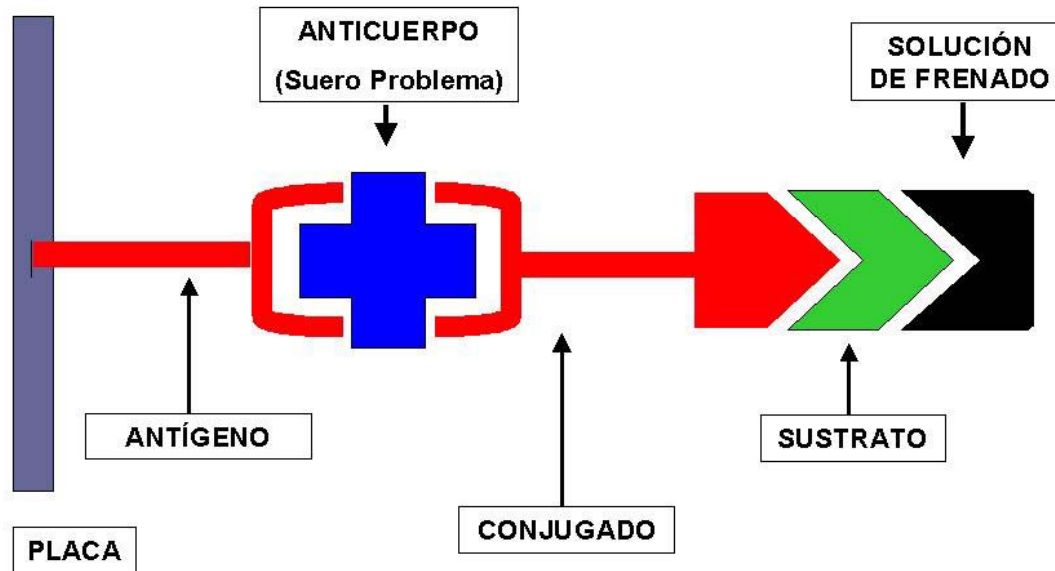
Una herramienta importante en avicultura es la prueba de ELISA. El presente trabajo se refiere a la interpretación de los histogramas generados al enviar muestras para la detección de anticuerpos específicos en avicultura.

Los exámenes de ELISA (enzyme linked immune sample assay) son ampliamente utilizados en la práctica de la medicina humana y veterinaria pues su utilidad comprende el diagnóstico de una gran gama de factores que van desde el SIDA hasta la presencia de enfermedades en un plantel pecuario. Esto se debe a que la prueba puede identificar partículas inherentes al sistema inmune en acción: los anticuerpos (Ac) y los antígenos (Ag). En este contexto es necesario saber interpretar las pruebas utilizando todos los datos que se ponen a nuestra disposición para poder ser certeros en el tratamiento y control de enfermedades así como para poder planificar y monitorear los esquemas de vacunación que implementamos en nuestras granjas.

PRUEBA DE ELISA (enzim linked inmuno sample assay)

Existen dos clases de ELISAs, aquellos que pueden identificar antígenos (Ag-ELISA-Ag) y aquellos que pueden identificar anticuerpos (ELISA-Ac), de estos nos referiremos a los ELISA-Ac. Estas pruebas están diseñadas para identificar cuantitativamente la concentración relativa de anticuerpos (Ac) producidos por el ave en respuesta a un antígeno determinado (vacuna o desafío de campo), es decir que el resultado de este ensayo nos indicará el comportamiento inmunitario del lote muestreado frente a una enfermedad en un momento determinado ¹.
Fundamento (figura 1) ¹

Los posillos de las placas del kit de ELISA están impregnados con el antígeno de la enfermedad que se quiere estudiar, a estos se añade el suero problema que debería tener los anticuerpos respectivos. En este punto los anticuerpos buscarán unirse a los antígenos ya que esa es su función natural en el organismo del animal formando lo que se conoce como complejo inmune (unión Ag-Ac). A continuación se agrega el conjugado que contiene un colorante y se va a unir a los complejos inmunes formados para desencadenar una reacción de color susceptible a ser medida en un espectrofotómetro. En el próximo paso se agrega un sustrato enzimático que va a iniciar la reacción de color. Por último esta reacción será detenida con una solución de frenado. La densidad óptica obtenida será directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes en la muestra .



DATOS QUE SE ENTREGAN

En el reporte entregado en los ELISAs realizados con equipos IDEXX se pueden observar los siguientes datos: Count, Mean, Gmean, SD, %CV, Min, Max, Date y Dil. A continuación explicaremos el significado de esta terminología.

Count: es el número de muestras que se han utilizado para realizar la prueba, en este parámetro no se hallan incluidos los controles positivos y negativos que se incluyen en la placa. Generalmente se usan 20 muestras para una población infinita en la cual se quieren estudiar enfermedades con prevalencias del 10% al 15% y niveles de confianza del 95%. Dependiendo de la situación sanitaria de la granja el número de muestras puede aumentar para volver más fiable el análisis estadístico.⁶

Mean: es el promedio de los títulos obtenidos al analizar la muestra.

Gmean: es el promedio geométrico de los títulos de los sueros analizados y en él se restringen los valores máximos y mínimos no significativos de la muestra con lo que se obtiene un resultado más cercano a la realidad siempre y cuando la muestra sea uniforme por lo que deberá ser analizado conjuntamente con los otros resultados estadísticos.

SD: es la desviación estándar (standard deviation) que nos expresa la medida de la dispersión para un conjunto de datos, es decir, que tan lejos de la media podrían estar los valores que están siendo analizados. Este valor es uno de los más importantes y nos da una primera idea de la forma en la que están agrupados los datos de la muestra que se está analizando³.

%CV: este valor que se expresa como porcentaje es el coeficiente de variación. La importancia de este coeficiente es que incluye los valores de media aritmética y desviación estándar con lo que nos muestra lo grande que es la desviación estándar en comparación a la media.³

Min: es el mínimo valor encontrado en el análisis de la muestra

Max: es el máximo valor encontrado en el análisis de la muestra.

Date: corresponde a la fecha en la que la muestra fue analizada con el equipo IDEXX.

Dil: es la dilución a la que el suero ha sido sometido, generalmente es de 1:500, es decir, se diluye 1µl de suero en 500 µl de diluyente.⁴

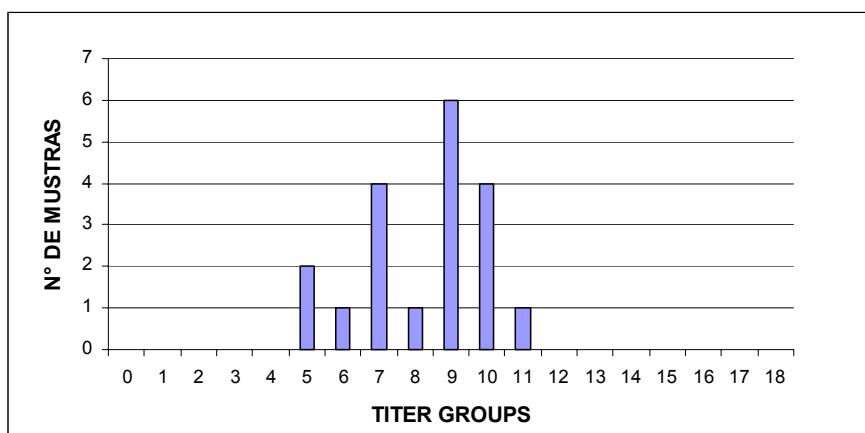
INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS ^{5, 6, 7}

Para revisar brevemente la interpretación de los datos obtenidos de una prueba ELISA veremos algunos ejemplos suponiendo que tratamos con un lote de pollos broiler que han sido vacunados con new castle en la incubadora y posteriormente revacunados a los 15 días y muestreados en la fecha de sacrificio. Es importante tomar en cuenta los antecedentes del lote ya que dependiendo de las circunstancias particulares de la granja y del manejo que esta reciba los datos estadísticos nos podrán revelar la presencia de una respuesta inmunológica, mal o buen uso de equipos para vacunar, un desafío superado o no, enfermedad clínica, etc.

Ejemplo 1

En este caso, al ver el histograma nos damos cuenta que los datos están distribuidos de manera uniforme en el centro del gráfico y que conforman una típica campana de Gauss (curva normal) lo que nos da una idea global de los resultados estadísticos. Primero podemos fijarnos en el promedio aritmético (mean) y geométrico (Gmean), estos parámetros están dentro del rango esperado para esta granja, además la diferencia entre los dos valores no es muy grande lo que se

Count	20
Mean	9453
Gmean	9020
SD	27,17
%CV	28,7
Min	4786
Max	14238



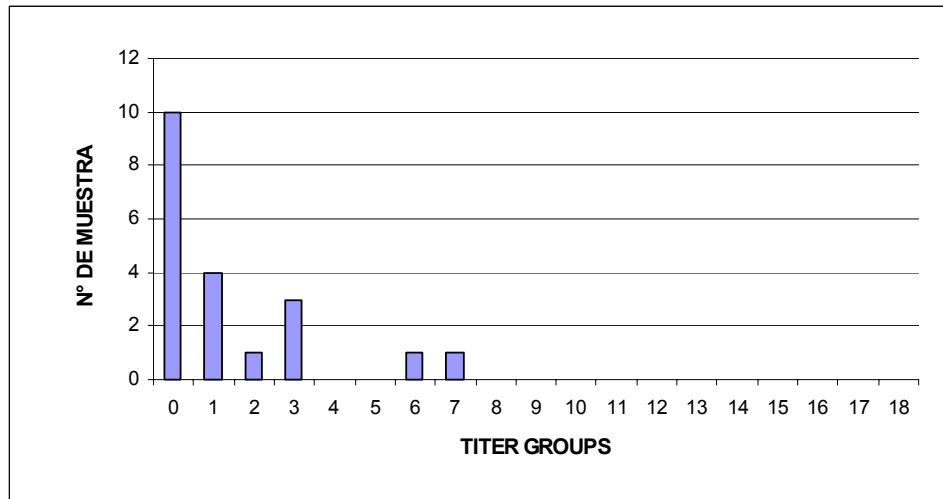
corroborar con el valor de SD (27.17) y %CV (28.7) que son óptimos. En este caso en particular se puede concluir que las aves de este lote se encuentran bien inmunizadas y que la vacunación se realizó correctamente.

Ejemplo 2

Aquí vemos claramente que la mayoría de los datos están agrupados a la izquierda del gráfico, en este caso el promedio aritmético es 1566 y el geométrico es 735. La gran diferencia entre estos datos es coherente con los valores de SD (1788) y %CV (114.2) obtenidos. Esto se da por que hay algunos datos dispersos en la mitad del gráfico (grupos 6 y 7) y otros que son completamente negativos (grupo 0). En términos generales

Count	20
Mean	1566
Gmean	735
SD	1788
%CV	114,2
Min	1
Max	7065

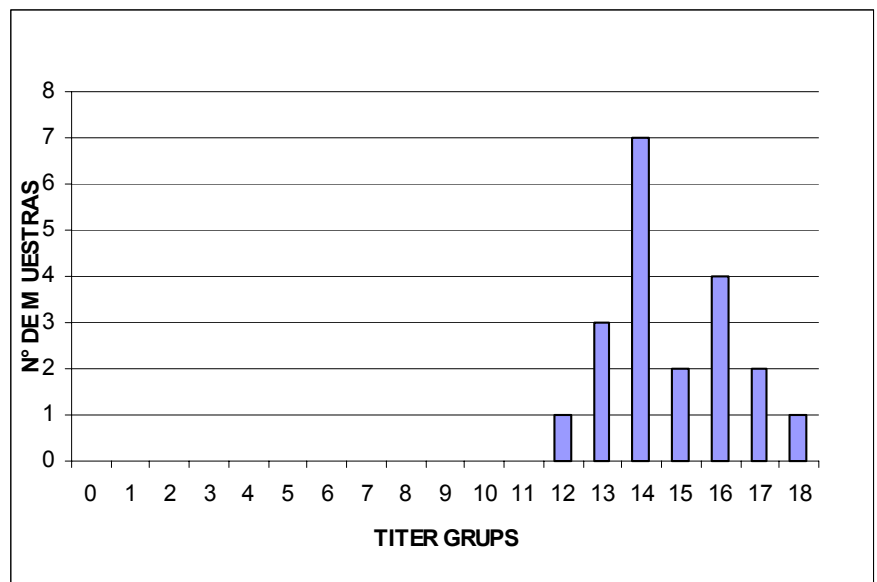
los datos obtenidos en este examen son muy bajos lo que significaría que la vacuna fue mala o que las aves no respondieron correctamente a la inmunización.



Ejemplo 3

Count	20
Mean	23578
Gmean	26252
SD	4008
%CV	17
Min	17623
Max	32104

En este caso vemos que los títulos se encuentran agrupados a la derecha del gráfico, aquí nuevamente la diferencia entre mean (23578) y Gmean (23252) es muy discreta y los valores de SD (4008) y %CV (17) muestran una distribución bastante uniforme. Los títulos muy altos nos sugieren que el lote se encuentra enfermo o ha sido sometido a un desafío importante.

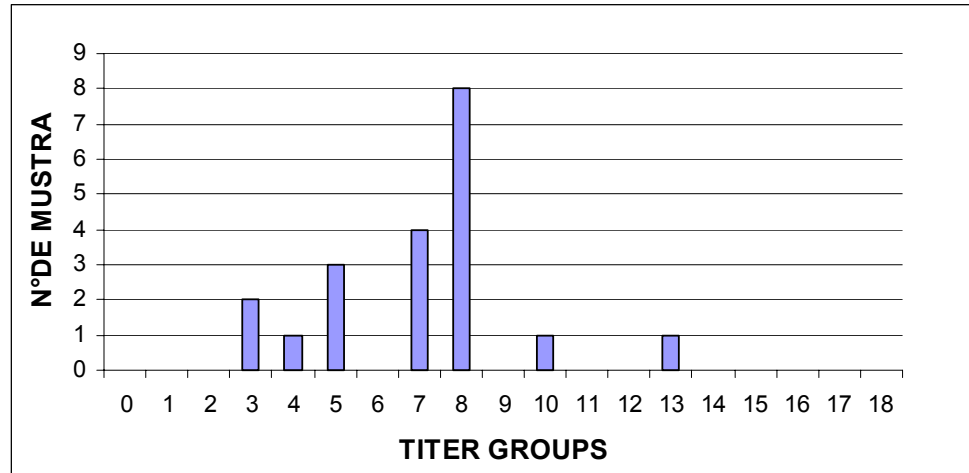


Ejemplo 4

Count	20
Mean	7521
Gmean	6703
SD	3552
%CV	47,2
Min	2166
Max	18238

En este último ejemplo se ha querido representar las típicas

consecuencias, a nivel serológico, de una mala vacunación en donde los datos están dispersos tanto a la izquierda como a la derecha y en el centro. Hay títulos muy bajos (grupos 3 y 4) indicativos de una vacunación deficiente y otros muy altos (grupo 13) consecuencia de un desafío o enfermedad en el lote a causa de la mala respuesta inmune.



LA LINEA BASE ⁷

Como los resultados obtenidos en los ELISAs pueden variar mucho de una zona geográfica a otra no es posible hablar en términos absolutos sobre los valores que deberíamos esperar (a pesar de que existen rangos razonables para cada enfermedad) entonces es necesario tomar en cuenta los datos históricos de nuestra explotación y con ellos realizar una curva consolidada del comportamiento inmunológico de nuestros lotes que constantemente será retroalimentada. Esta curva o "línea base" nos servirá como referencia para mejorar o mantener nuestros procesos una vez que analicemos el resultado de los ELISAs cotejándolos con los parámetros productivos de nuestro negocio, también se pueden hacer gráficos con valores máximos y mínimos para facilitar el análisis de los resultados obtenidos.

APLICACIONES ESPECÍFICAS DE LAS PRUEBAS ELISA ^{4, 7}

El monitoreo serológico de nuestros lotes nos puede ayudar a hacer algunos análisis para guiarnos en la toma de decisiones. Algunas de estas aplicaciones las describimos a continuación.

- Evaluar la eficacia y eficiencia de las vacunaciones. Esto implica el analizar los métodos de vacunación, insumos utilizados, trabajo del personal, rutas de aplicación, etc.
- Determinar el período en el cual se hace presente un desafío y así poder ajustar los calendarios de vacunación para obtener una respuesta inmune óptima.
- Evaluar los niveles de anticuerpos transmitidos por vía materna a los pollitos bb y poder determinar la fecha más adecuada para la vacunación de gumboro.
- Evaluar la eficiencia de los "priming" previos a las vacunas inactivadas.

- e) Analizar históricamente los métodos utilizados en bioseguridad y preparación de instalaciones para identificar que procedimientos cumplen mejor con nuestros objetivos.

CONCLUSIONES

Como ya mencionamos las pruebas de ELISA se han convertido en una herramienta muy importante a la hora de evaluar los procesos sanitarios en una explotación avícola por lo que su correcto uso e interpretación son indispensables.

Es importante recordar que la interpretación final de los resultados tendrá que ser tomada dentro de la particularidad de cada granja y de cada enfermedad valiéndose del historial de nuestra explotación o de la zona en la que estemos trabajando. También hay que recalcar que los resultados de laboratorio siempre deben de ser cotejados con los parámetros productivos obtenidos para poder tomar decisiones adecuadas, vale decir que “hay que ver el bosque y no solo los árboles”.

Por último diremos que la gran demanda de nuevas tecnologías en respuesta al creciente desarrollo del sector impulsará la futura aparición y masificación de pruebas más contundentes y económicas que contribuyan a un mejor diagnóstico de la situación sanitaria en las granjas avícolas del mundo.

BIBLIOGRAFÍA

1. SAYD. S., MUÑOZ R. IDEXX Laboratorios. I MEDICINA PREVENTIVA EN PONEDORAS Y POLLOS DE ENGORDE. Avicultura Profesional. 2004. VOL 22, no 3. Pág 18, 19, 20, 21.
2. SAYD. S., MUÑOZ R. IDEXX Laboratorios. II MEDICINA PREVENTIVA EN PONEDORAS Y POLLOS DE ENGORDE. Avicultura Profesional. 2004. VOL 22, no 4. Pág 24, 25.
3. VAN L. B. et al. EL MONITOREO MEDIANTE ELISA. Avicultura Profesional. 2003 VOL 21 no 10. Pág 18, 19, 20, 21, 22.
4. IDEXX. Vigilancia de poblaciones vacunadas mediante la interpretación y análisis de los resultados serológicos (muestreo y tamaño de la muestra). Disponible en: URL: <http://al.idexx.com/produccion/boletin>
5. IDEXX. Uso de la Serología—ELISA en la Industria Avícola. Disponible en: URL: <http://al.idexx.com/produccion/boletin>
6. VINUEZA B. C., GALLEGOS M. C. INMUNODIAGNÓSTICO DE *Cysticercus bovis* EN EL CAMAL FRIGORÍFICO MUNICIPAL DE RIOBAMBA (tesis bachiller) FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIO Y ZOOTECNIA. UNIVERSIDAD CENTRAL DE ECUADOR. 2001 47 PÁG.
7. ANDERSON A. D., SWEENEY J. D., WILLIAMS A. T. ESTADÍSTICA PARA ADMINISTRACIÓN Y ECONOMÍA. 7ma edición. México. Ed. Thomsom Editores. 1999. Pág 78 - 107

Trabajo recibido el 07.05.05 nº de referencia 070501_RED.VET. Enviado por su autor, crisvinu, miembro de la [Comunidad Virtual Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org)®. Publicado en [REDVET®](http://www.veterinaria.org/revistas/redvet) el 01/07/05. Se autoriza la difusión y reenvío de esta publicación electrónica en su totalidad o parcialmente, siempre que se cite la fuente, enlace con Veterinaria.org - www.veterinaria.org y [REDVET®](http://www.veterinaria.org/revistas/redvet) www.veterinaria.org/revistas/redvet y se cumplan los requisitos indicados en [Copyright](http://www.veterinaria.org) 1996-2005. [Revista Electrónica de Veterinaria REDVET®](http://www.veterinaria.org), ISSN 1695-7504 - [Veterinaria.org®](http://www.veterinaria.org) - [Comunidad Virtual Veterinaria.org®](http://www.veterinaria.org)