



¿De qué herramientas comerciales disponemos actualmente y cuáles son las ventajas y desventajas de los sistemas vigentes?

**J.J. (Sjaak) de Wit**

DVM, PhD, EBVS® Especialista Europeo en Avicultura Veterinaria

Royal GD (Deventer) y Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Utrecht, Países Bajos

Vicepresidente de la Asociación Mundial Veterinaria Agrícola (WVPA)



Herramientas de diagnóstico: según la situación, ¿qué pregunta debemos hacernos?

**B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO**

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la influenza aviar y su propósito

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
<b>Detección del agente<sup>1</sup></b>						
Aislamiento del virus	+	+++	+	+++	+	-
Detección de antígeno	+	+	+	+	+	-
RT-PCR en tiempo real	++	+++	++	+++	++	-
<b>Detección de respuesta inmunitaria</b>						
AGID	+(Influenza A)	+(Influenza A)	++(Influenza A)	+(convaleciente)	++(Influenza A)	++(Influenza A)
HI	+++ (H5 o H7)	++ (H5 o H7)	+++ (H5 o H7)	++ (convaleciente)	+++ (H5 o H7)	+++ (H5 o H7)
ELISA	+	+	++	+(convaleciente)	++	++

Clave: +++ = recomendado para este propósito; ++ = recomendado pero tiene limitaciones; + = adecuado en muy pocas situaciones; - = no adecuado para este propósito

RT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa; AGID = inmunodifusión en gel de agar; HI = prueba de inhibición de la hemaglutinina; ELISA = enzimoimmunoanálisis.

1 Se recomienda aplicar una combinación de métodos de identificación a una misma muestra clínica.

## ¿Qué propósitos podría tener el uso del diagnóstico del virus de la Influenza Aviar?

- Demostrar la ausencia de infección
- Necesidad de diagnóstico: infección grave?
- Verificar la aplicación de la vacuna
- Estimar el nivel de protección que proporciona la vacunación contra un determinado virus de desafío
- Epidemiología, fuente de la infección.

## ¿Qué propósitos podría tener el uso del diagnóstico del virus de la Influenza Aviar?

- Demostrar la ausencia de infección
- Necesidad de diagnóstico: infección grave?
- Verificar la aplicación de la vacuna
- Estimar el nivel de protección que proporciona la vacunación contra un determinado virus de desafío
- Epidemiología, fuente de la infección.

### Factores a tener en cuenta

- Especies hospedadoras?
- Parvadas vacunadas frente a no vacunadas
  - Vacunas de virus completo o vacunas DIVA?
- Epidemia frente a endemia
- Múltiples subtipos de HA involucrados?

## ¿Qué propósitos podría tener el uso del diagnóstico del virus de la Influenza Aviar?

- Demostrar la ausencia de infección
- Necesidad de diagnóstico: infección grave?
- Verificar la aplicación de la vacuna
- Estimar el nivel de protección que proporciona la vacunación contra un determinado virus de desafío
- Epidemiología, fuente de la infección.

### Factores a tener en cuenta

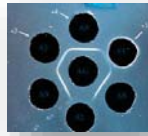
- Especies hospedadoras?
- Parvadas vacunadas frente a no vacunadas
  - Vacunas de virus completo o vacunas DIVA?
- Epidemia frente a endemia
- Múltiples subtipos de HA involucrados?

Validados como aptos para el fin previsto

## Detección del Virus

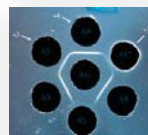
- Ensayos inmunológicos de captura de antígenos (punto de cuidado)
  - Mayoritariamente desarrolladas/validadas para cepas humanas, para virus de la gripe A en general
  - Sensibilidad variable, a menudo de 3 a 4 log<sub>10</sub> menos sensible que el VI
  - Recomendado sólo para muestras fuertemente positivas (como HP, aves clínicamente afectadas o muertas, a nivel de bandada)
- RT-PCR
  - Gen conservado (normalmente M), subtipo HA específico (por ejemplo, H5), subtipos N
  - Deben validarse adecuadamente utilizando material clínico para demostrar que las pruebas son "aptas para el propósito".
  - Alta sensibilidad (un CT alto ya no podría significar una infección activa)
  - Importancia de la monitorización continua de cebadores y sondas (la combinación de M y NP podría ser la mejor)
  - Todas las especies

## Detección de anticuerpos



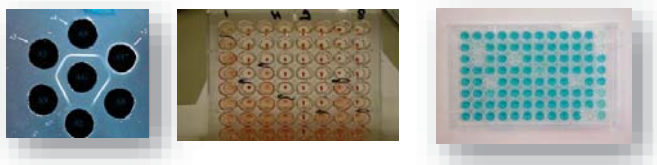
- Prueba de inmunodifusión en gel de agar
  - Específica de la gripe A (anticuerpos contra la nucleoproteína y los antígenos de la matriz)
  - Anticuerpos precipitantes, adecuada para pollos y pavos, menos fiable en otras especies
  - La mejor para detectar infecciones agudas, diagnóstico de bandadas.
- Prueba de inhibición de la hemaglutinación
- ELISA

## Detección de Anticuerpos



- Prueba de inmunodifusión en gel de agar
  - Específica de la gripe A (anticuerpos contra la nucleoproteína y los antígenos de la matriz)
  - Anticuerpos precipitantes, adecuada para pollos y pavos, menos fiable en otras especies
  - La mejor para detectar infecciones agudas, diagnóstico de bandadas
- Prueba de inhibición de la hemaglutinación
  - Específicos de Subtipo
  - Todas las especies
  - Los sueros que no sean de pollo pueden necesitar absorción con glóbulos rojos de pollo antes de la prueba para evitar la aglutinación inespecífica.
  - Posible inhibición inespecífica de la aglutinación causada por inhibición estérica cuando el suero analizado contiene anticuerpos contra el mismo subtipo N que el antígeno H utilizado en la prueba de HI.
    - Uso de dos antígenos para cada subtipo de hemaglutinina con neuraminidasa heteróloga (es decir, H5N1 y H5N6).
      - Ausencia de antígeno H5N2 en zonas endémicas de H9N2
    - Otra posibilidad es que el antígeno H utilizado sea una proteína H recombinante o purificada que carezca de proteína N
  - Fuerte correlación entre los títulos de HI y el nivel de protección cuando se utiliza un antígeno homólogo.
- ELISA

# Detección de anticuerpos



- Prueba de inmunodifusión en gel de agar
  - Específica de la gripe A (anticuerpos contra la nucleoproteína y los antígenos de la matriz)
  - Anticuerpos precipitantes, adecuada para pollos y pavos, menos fiable en otras especies
  - La mejor para detectar infecciones agudas, diagnóstico de bandadas
- Prueba de inhibición de la hemaglutinación
  - Específicos de Subtipo
  - Todas las especies
  - Los sueros que no sean de pollo pueden necesitar absorción con glóbulos rojos de pollo antes de la prueba para evitar la aglutinación inespecífica.
  - Posible inhibición inespecífica de la aglutinación causada por inhibición estérica cuando el suero analizado contiene anticuerpos contra el mismo subtipo N que el antígeno H utilizado en la prueba de HI.
    - Uso de dos antígenos para cada subtipo de hemaglutinina con neuraminidasa heteróloga (es decir, H5N1 y H5N6).
      - Ausencia de antígeno H5N2 en zonas endémicas de H9N2
      - Otra posibilidad es que el antígeno H utilizado sea una proteína H recombinante o purificada que carezca de proteína N
  - Fuerte correlación entre los títulos de HI y el nivel de protección cuando se utiliza un antígeno homólogo.
- ELISA
  - Antígeno: de virus completo, nucleoproteína o HA H5 (algunas otras proteínas menos inmunogénicas)
  - Indirecta (conjugado pollo/ pavo), bloqueante (todas las especies)
  - Los títulos ELISA tienen poca correlación con la protección (todo tipo de anticuerpos, no sólo anticuerpos "protectores")

## Vacunas H5 y opciones DIVA actuales

- Vacunas
    - Virus completo inactivado
    - Vacuna de subunidades,
    - Vacunas vivas vectorizadas (HVT, Pox, otras)
    - mARN, ADN, .....
- Sólo respuesta de anticuerpos contra el inserto (p. ej.) H5  
No contra otras proteínas (M, Np, .....)
- Encontrar una combinación DIVA adecuada
- Pruebas
    - RT-PCR, aislamiento del virus, tinción, in situ, ELISA (general), ELISA (proteínas específicas), ELISA específico del genotipo, prueba HI, AGPT
  - ¿Condiciones de campo, cepas/vacunas no H5?

## Comprobación de la ausencia de virus del subtipo H5 (infección), éxito de la vacunación (pruebas/antígenos disponibles en el mercado)

Situación en el campo	AGID	HI H5	ELISA			Antígeno	RT-PCR	
			Virus completo	Np	H5		M	H5
Ninguna vacuna AIV, ningún otro subtipo de desafío	+	++	++	++	++	+	++	++
Ninguna vac H5, otro subtipo/ vac de desafío	-	++ (N!)	-	-	++	+	++	++
Vacuna H5 con virus completo	-	-	-	-	-	+	++	++
Vacuna H5 DIVA , ningún otro subtipo de vacuna/ desafío	+?	-	-	++	-	+	++	++
Vacuna H5 DIVA +otro subtipo de vacuna/ desafío	-	-	-	-	-	+	++	++
Nivel de adopción de la vacuna H5	±	++ (vacuna hom)	++		++	-	-	-
Estimación del nivel de protección de H5	-	++ (campo hom)	-	-	±	-	-	-

## Comprobación de la ausencia de virus del subtipo H5 (infección), éxito de la vacunación (pruebas/antígenos disponibles en el mercado)

Situación en el campo	AGID	HI H5	ELISA			Antígeno	RT-PCR	
			Virus completo	Np	H5		M	H5
Ninguna vacuna AIV, ningún otro subtipo de desafío	+	++	++	++	++	+	++	++
Ninguna vac H5, otro subtipo/ vac de desafío	-	++ (N!)	-	-	++	+	++	++
Vacuna H5 con virus completo	-	-	-	-	-	+	++	++
Vacuna H5 DIVA , ningún otro subtipo de vacuna/ desafío	+?	-	-	++	-	+	++	++
Vacuna H5 DIVA +otro subtipo de vacuna/ desafío	-	-	-	-	-	+	++	++
Nivel de adopción de la vacuna H5	±	++ (vacuna hom)	++		++	-	-	-
Estimación del nivel de protección de H5	-	++ (campo hom)	-	-	±	-	-	-

## Comprobación de la ausencia de virus del subtipo H5 (infección), éxito de la vacunación (pruebas/antígenos disponibles en el mercado)

Situación en el campo	AGID	HI H5	ELISA			Antígeno	RT-PCR	
			Virus completo	Np	H5		M	H5
Ninguna vacuna AIV, ningún otro subtipo de desafío	+	++	++	++	++	+	++	++
Ninguna vac H5, otro subtipo/ vac de desafío	-	++ (N!)	-	-	++	+	++	++
Vacuna H5 con virus completo	-	-	-	-	-	+	++	++
Vacuna H5 DIVA , ningún otro subtipo de vacuna/ desafío	+?	-	-	++	-	+	++	++
Vacuna H5 DIVA +otro subtipo de vacuna/ desafío	-	-	-	-	-	+	++	++
Nivel de adopción de la vacuna H5	±	++ (vacuna hom)	++		++	-	-	-
Estimación del nivel de protección de H5	-	++ (campo hom)	-	-	±	-	-	-

## Comprobación de la ausencia de virus del subtipo H5 (infección), éxito de la vacunación (pruebas/antígenos disponibles en el mercado)

Situación en el campo	AGID	HI H5	ELISA			Antígeno	RT-PCR	
			Virus completo	Np	H5		M	H5
Ninguna vacuna AIV, ningún otro subtipo de desafío	+	++	++	++	++	+	++	++
Ninguna vac H5, otro subtipo/ vac de desafío	-	++ (N!)	-	-	++	+	++	++
Vacuna H5 con virus completo	-	-	-	-	-	+	++	++
Vacuna H5 DIVA , ningún otro subtipo de vacuna/ desafío	+?	-	-	++	-	+	++	++
Vacuna H5 DIVA +otro subtipo de vacuna/ desafío	-	-	-	-	-	+	++	++
Nivel de adopción de la vacuna H5	±	++ (vacuna hom)	++		++	-	-	-
Estimación del nivel de protección de H5	-	++ (campo hom)	-	-	±	-	-	-

## Comprobación de la ausencia de virus del subtipo H5 (infección), éxito de la vacunación (pruebas/antígenos disponibles en el mercado)

Situación en el campo	AGID	HI H5	ELISA			Antígeno	RT-PCR	
			Virus completo	Np	H5		M	H5
Ninguna vacuna AIV, ningún otro subtipo de desafío	+	++	++	++	++	+	++	++
Ninguna vac H5, otro subtipo/ vac de desafío	-	++ (N!)	-	-	++	+	++	++
Vacuna H5 con virus completo	-	-	-	-	-	+	++	++
Vacuna H5 DIVA, ningún otro subtipo de vacuna/ desafío	+?	-	-	++	-	+	++	++
Vacuna H5 DIVA +otro subtipo de vacuna/ desafío	-	-	-	-	-	+	++	++
Nivel de adopción de la vacuna H5	±	++ (vacuna hom)	++		++	-	-	-
Estimación del nivel de protección de H5	-	++ (campo hom)	-	-	±	-	-	-

## Comprobación de la ausencia de virus del subtipo H5 (infección), éxito de la vacunación (pruebas/antígenos disponibles en el mercado)

Mensaje para recordar

Situación en el campo	AGID	HI H5	ELISA			Antígeno	RT-PCR	
			Virus completo	Np	H5		M	H5
Ninguna vacuna AIV, ningún otro subtipo de desafío	+	++	++	++	++	+	++	++
Ninguna vac H5, otro subtipo/ vac de desafío	-	++ (N!)	-	-	++	+	++	++
Vacuna H5 con virus completo	-	-	-	-	-	+	++	++
Vacuna H5 DIVA, ningún otro subtipo de vacuna/ desafío	+?	-	-	++	-	+	++	++
Vacuna H5 DIVA +otro subtipo de vacuna/ desafío	-	-	-	-	-	+	++	++
Nivel de adopción de la vacuna H5	±	++ (vacuna hom)	++		++	-	-	-
Estimación del nivel de protección de H5	-	++ (campo hom)	-	-	±	-	-	-

- En cualquier situación, es posible realizar pruebas DIVA utilizando pruebas disponibles en el mercado
- Sin embargo, el número de opciones varía dependiendo de la situación en el campo.





Food and Agriculture  
Organization of the  
United Nations



World Organisation  
for Animal Health  
Founded as OIE

¡Muchas gracias por su atención!