

# OFFLU



- Metodologías y protocolos para la identificación de la infección por el virus de la influenza aviar en poblaciones vacunadas y no vacunadas

y

- Programa Piloto de Comparación de datos sobre la Influenza Aviar (*AIM-Avian Influenza Matching*)

Presentado en la Reunión Técnica sobre Vacunación contra la IAAP: Enfoque, herramientas, conocimientos y experiencia para las Américas 3 de marzo de 2023 por Gounalan Pavade - (Secretaría de OFFLU)

1

1

# Normas de la OMSA sobre vacunación



- El Código Sanitario para los Animales Terrestres (Código Terrestre) reconoce que la vacunación puede utilizarse como una herramienta de control complementaria eficaz, que forma parte de un programa de control de enfermedades
  - Capítulo 10.4 [https://www.woah.org/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-codigo-terrestre/?id=169&L=1&htmlfile=chapitre\\_avian\\_influenza\\_viruses.htm](https://www.woah.org/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-codigo-terrestre/?id=169&L=1&htmlfile=chapitre_avian_influenza_viruses.htm)
- La vacunación no afectará al estatus de país o zona libre de influenza aviar de alta patogenicidad **siempre que la vigilancia confirme la ausencia de infección.**
- En todas las manadas vacunadas deben realizarse pruebas para garantizar la ausencia de circulación del virus.
- Las pruebas deben repetirse en función del riesgo existente en el país.
- También deben aportarse pruebas que demuestren la eficacia del programa de vacunación.
- Además, el Manual de Pruebas de Diagnóstico y Vacunas para los Animales Terrestres de la OIE (Manual Terrestre) establece normas sobre los requisitos de las vacunas
  - Capítulo 3.3.4. [https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahm/3.03.04\\_AI.pdf](https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.03.04_AI.pdf)

2

2

## Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la influenza avar y su propósito

### B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la influenza avar 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) o	+++ (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 = enzimoanálisis.

3

3

## Estrategia para la diferenciación entre animales infectados y vacunados (DIVA)-IAAP

- La estrategia DIVA se ha propuesto como posible solución para lograr la erradicación de la IAAP y la IABP H5/H7 sin necesidad de sacrificar aves de forma masiva y sin el consiguiente perjuicio económico que esto conllevaría, especialmente en países en vías de desarrollo
- Esta estrategia proporciona las ventajas de la vacunación (menos virus en el medio ambiente), pero además la capacidad para identificar parvadas infectadas permitiría la puesta en práctica de otras medidas de control, como el sacrificio sanitario.
- En las estrategias DIVA, se utilizan uno de los dos siguientes mecanismos de detección en la población vacunada:
  - 1) detección del virus de la influenza A (“**DIVA respecto al virus**”), o
  - 2) detección de anticuerpos contra la infección por el virus natural de la influenza A (“**DIVA serológica**”) - Para el empleo de la DIVA serológica, deben utilizarse sistemas de vacunación que faciliten la detección de la exposición al virus natural en poblaciones vacunadas. Se han utilizado varios sistemas. Estos sistemas aún no se han validado en condiciones de campo.

4

4

## DIVA serológica

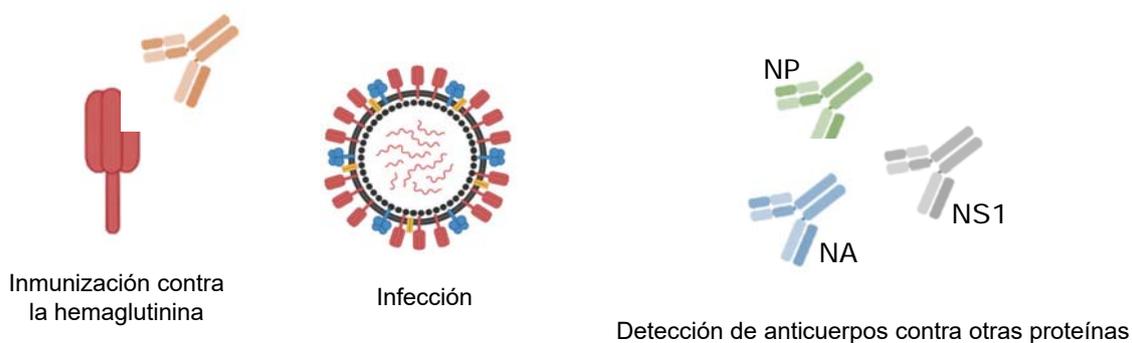


- Para el empleo de la DIVA serológica, deben utilizarse sistemas de vacunación que faciliten la detección de la exposición al virus natural en poblaciones vacunadas. Se han utilizado varios sistemas.
- En primer lugar, uso de vacunas que contengan un virus con el mismo subtipo de hemaglutinina (H) pero diferente neuraminidasa (N) que el virus natural. Los anticuerpos frente a la N del virus natural actúan como marcadores naturales de la infección.
- Una segunda opción de DIVA serológica es el uso de vacunas que contengan solo HA, p. ej. vacunas recombinantes, ya sean replicantes o no, lo cual permite utilizar sistemas validados de AGID clásico validado y ELISA basados en nucleoproteínas (NP) o proteínas de la matriz para detectar anticuerpos indicativos de infección en aves vacunadas.
- Por último, en el caso de las vacunas inactivadas, se ha descrito una prueba que detecta anticuerpos contra las proteínas víricas no estructurales o M2e.
- Estos sistemas aún no se han validado en condiciones de campo.

5

5

## Vacunas compatibles con DIVA serológica



6

6

## Vacunas compatibles con DIVA serológica



Vacunas vectorizadas HVT  
(asociadas a células vivas)



Vacunas ND vectorizadas  
(muertas +adyuvantes)

Vacunas DNA



vacunas de subunidades  
(HA recombinante)



Vacunas de ARN autoamplificado



**Múltiples herramientas DIVA**

- ELISA anti-NA que empareja el Nx circulante
- Anticuerpos anti NP/M

7

7

## Vacunas compatibles con DIVA serológica



Vacunas de virus completo  
inactivado (VTI) de ingeniería  
inversa (rg)



Algunas limitaciones, pero sigue siendo  
compatible  
(necesidad de NA heteróloga en la vacuna para  
diferenciar; anticuerpos anti-NS1 aunque menor  
sensibilidad)

Partículas similares a virus



(necesidad de NA heteróloga en la vacuna para diferenciar;  
ELISA anti NP y NS1)

8

8

## Estrategia "tipo DIVA": centinelas no vacunados



### Vigilancia centinela

- ❑ El uso de aves centinela y el estrecho seguimiento de la situación de la parvada no se ajustan a la definición de una estrategia DIVA, pero estos métodos pueden utilizarse para vigilar las parvadas vacunadas;
- ❑ Si se va a utilizar la vigilancia centinela, se deberá mantener un cierto número de aves centinela no vacunadas (normalmente el 1%) y dispersarlas adecuadamente en la parvada vacunada y someterlas a **pruebas virológicas y serológicas**.

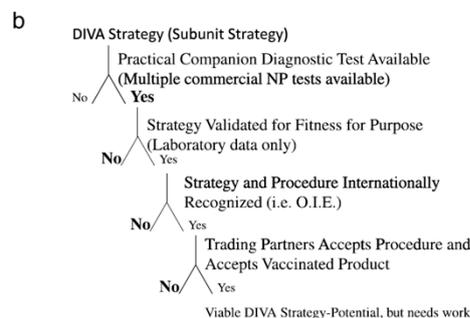
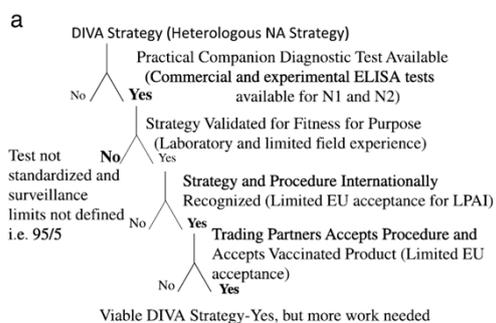
Existen cuestiones prácticas...

- ❑ Sin un buen cumplimiento por parte de los ganaderos y un sistema de gestión adecuado, la presencia de aves centinela en la parvada puede facilitar la introducción y transmisión del VIAAP en este grupo de aves;
- ❑ Desde el punto de vista logístico, es difícil identificar a los animales en grandes bandadas.
- ❑ Los resultados serológicos "falsos positivos" no son infrecuentes → dificultad de interpretación e interrupciones innecesarias del comercio;
- ❑ Reactividad cruzada de los anticuerpos contra el LPAIV

9

9

## Una estrategia DIVA viable



Fuente: David Suarez (2012)

10

10

## Estrategias DIVA

TABLE 1. LIST OF AVAILABLE STRATEGIES FOR DIFFERENTIATING INFECTED ANIMALS FROM VACCINATED ANIMALS, WITH SOME OF THEIR ADVANTAGES AND LIMITATIONS IN GENERAL

Strategy	Sentinel bird	Recombinant subunit vaccines	Heterologous NA	Differential immune response against protein (NS1, M2 and HA2 gp)
Procedure and vaccine used	Naïve unvaccinated birds are marked and randomly spread in a vaccinated flock Sentinel birds are routinely tested for influenza virus exposure	Vaccine using a vector expressing HA and NA proteins Example: Fowlpox-vectored recombinant vaccine for the H5 subtype	Vaccines containing the same HA subtype as the field strain, but a different NA subtype. Example: If the field virus is H7N2, the vaccine is H7N3	Vaccination using whole-killed virus Observation of the differential immune responses to the targeted protein (NS1, M2, or HA2)
Available companion diagnostic test	Hemagglutinin Inhibition (HI) test Agar gel immunodiffusion Type A-specific ELISA (detect anti-NP antibodies)	Agar gel precipitin ELISA targeting the antibodies to matrix (M) protein or the nucleoprotein (NP) Fluorescence microsphere immunoassay (FMIA)	Neuraminidase Inhibition (NI) test Indirect immunofluorescence assay (iFAT) FMIA Modified NI test	ELISA-based targeting the antibodies to specified proteins
Advantages	Low cost Readily applicable Sensitive procedure for monitoring in vaccinated flock	Efficacious in providing protection Commercially available Mass administration The standard diagnostic tests are applicable	Efficacious in providing protection Rapidly available through reverse genetics technology	Conventional inactivated virus can be used for vaccination Only a single diagnostic test needed
Limitations	Labor intensive Time consuming Naïve birds can potentially act as virus amplifiers and be the source of infection	Test sensitivity is yet to be determined	Prior knowledge on circulating strain Possible introduction of the same NA subtype field strain with the NA subtype used for vaccination Undetermined sensitivity of serologic testing Low-throughput screening capacity iFAT—time consuming, laborious and the result interpretation is subjective	Risk of false-positive due to the presence of protein contaminant from nonpurified vaccine i.e. NS1 protein Risk of false-negative in surinfected host due to the inability of host to seroconvert HA2 gp approach—need more studies

Fuente: Hasan et al (2016)

11

11

## Complicaciones de la DIVA serológica

- El muestreo serológico requiere más tiempo que el virológico
- Los patos son particularmente susceptibles a otros subtipos de IA
- Las aves de cría ecológica, criadas en libertad y de traspatio corren un mayor riesgo de exposición a otros virus de la gripe aviar distintos del H5Nx.
- Las estrategias de refuerzo heterólogo con diferentes tecnologías de vacunas podrían limitar el número de opciones de ensayo.



12

12

## Conclusiones sobre la DIVA



- Se han propuesto muchas estrategias DIVA diferentes para el virus de la influenza aviar, pero todas se basan en varios elementos clave y necesitan validación sobre el terreno;
- Las pruebas serológicas DIVA podrían ser uno de los componentes, pero se caracterizan por ser relativamente insensibles y estar sujetas a falsos positivos, además de no proporcionar prácticamente ninguna información sobre el estado de la infección en las dos últimas semanas de vida de una parvada vacunada;
- La serología DIVA negativa en una parvada sí que proporciona alguna información, pero es probable que haya muchas falsas alarmas al utilizarla porque las pruebas disponibles se basan en la detección de anticuerpos contra NP, que es común a todos los virus de la Influenza A.
- Todas las vacunas DIVA requieren una prueba de anticuerpos de diagnóstico complementaria sensible, específica y rentable que pueda realizarse en un gran número de muestras.
- Debe llevarse a cabo una investigación científica suficiente para demostrar que la prueba es "apta para el propósito".

13

13

## Vigilancia para la detección de infecciones



- Debe tener varios niveles y basarse en el riesgo/objetivo en lugar de basarse en muestras aleatorias para detectar la infección a un nivel determinado;
- Pruebas rutinarias de aves muertas, pero también es importante establecer un número de muestras adecuado para parvadas de diferentes tamaños y tasas de mortalidad de fondo existentes;
- Sistemas de vigilancia que demuestren que la infección en las manadas no se está transmitiendo ( $R < 1$ ). En la actualidad, los expertos están debatiendo la forma de conseguirlo.

14

14

  
 WOAH | FAO  
 network of expertise on animal influenza

# Carga de las pruebas cuando se aplica la vacunación (Europa)

---

REGULATIONS

COMMISSION DELEGATED REGULATION (EU) 2023/361  
 of 28 November 2022  
 supplementing Regulation (EU) 2016/429 of the European Parliament and the Council as regards  
 rules for the use of certain veterinary medicinal products for the purpose of prevention and  
 control of certain listed diseases  
*(Text with EEA relevance)*  
 THE EUROPEAN COMMISSION.

PART 2

**SPECIFIC CONDITIONS FOR THE REINFORCED LABORATORY SURVEILLANCE TO BE IMPLEMENTED IN THE  
 VACCINATION AND PERI-VACCINATION ZONES DURING EMERGENCY PROTECTIVE VACCINATION FOR  
 PREVENTION AND CONTROL OF HPAI**

**Vacunación de emergencia**

Laboratory surveillance by collection of samples for virological testing shall be implemented **every two weeks** in the establishments where emergency protective vaccination has been carried out to detect occurrence of infection with HPAI field virus. The surveillance has to enable detection of a prevalence of infection with the HPAI virus in the vaccinated establishment of 5 % or less with a confidence level of 95 %.

15

15

  
 WOAH | FAO  
 network of expertise on animal influenza

# Carga de las pruebas cuando se aplica la vacunación (Europa)

---

REGULATIONS

COMMISSION DELEGATED REGULATION (EU) 2023/361  
 of 28 November 2022  
 supplementing Regulation (EU) 2016/429 of the European Parliament and the Council as regards  
 rules for the use of certain veterinary medicinal products for the purpose of prevention and  
 control of certain listed diseases  
*(Text with EEA relevance)*  
 THE EUROPEAN COMMISSION.

PART 5

**SPECIFIC CONDITIONS FOR PREVENTIVE VACCINATION OF HPAI**

**Vacunación Preventiva**

2. Reinforced surveillance to be implemented in case of preventive vaccination:

2.1. enhanced passive surveillance shall be implemented in the vaccinated establishments by **weekly virological** testing of a **representative sample of dead birds collected within one week**:

16

16

# Carga de las pruebas cuando se aplica la vacunación (Europa)



REGULATIONS

COMMISSION DELEGATED REGULATION (EU) 2023/361  
of 28 November 2022  
supplementing Regulation (EU) 2016/429 of the European Parliament and the Council as regards rules for the use of certain veterinary medicinal products for the purpose of prevention and control of certain listed diseases  
(Text with EEA relevance)

THE EUROPEAN COMMISSION.



PART 5

**SPECIFIC CONDITIONS FOR PREVENTIVE VACCINATION OF HPAI**

2.2. after the start of vaccination, the following active surveillance has to be carried out by an official veterinarian in vaccinated establishments at least **every 30 days** to detect occurrence of infection with HPAI field virus:

(b) a collection of representative samples for laboratory surveillance by **serological or virological testing** to enable detection of a prevalence of HPAI virus infection in the epidemiological unit of 5 % with a confidence level of 95 %, using appropriate methods and protocols that allow early detection of the virus and taking into account the specific characteristics of the vaccine used;

17

17

# Ejemplos de Vacunación Preventiva (Europa)



**Zonas avícolas densamente pobladas**

3 provincias italianas

PART 5

SPECIFIC CONDITIONS FOR PREVENTIVE VACCINATION OF HPAI

2.2. after the start of vaccination, the following active surveillance has to be carried out by an official veterinarian in vaccinated establishments at least **every 30 days** to detect occurrence of infection with HPAI field virus:

(b) a collection of representative samples for laboratory surveillance by **serological or virological testing** to enable detection of a prevalence of HPAI virus infection in the epidemiological unit of 5 % with a confidence level of 95 %, using appropriate methods and protocols that allow early detection of the virus and taking into account the specific characteristics of the vaccine used;

Regione	Province	Production type	Number of Holdings	Number of animals
A	1	Layer breeders	10	227.620
		Breeder pullets	4	158.000
		Laying pullets	14	631.100
		Meat turkeys	45	988.483
B	2	Layer breeders	1	39.500
		Laying pullets	6	739.086
		Meat turkeys	30	528.312
B	3	Layer breeders	3	70.000
		Breeder pullets	3	300.600
		Laying pullets	30	1.862.605
		Meat turkeys	199	4.174.615
<b>Cumulative number</b>			<b>345</b>	<b>9.719.921</b>

Prevalencia del 5% (95% CI)

↓

**20.000 muestras que se analizarán mensualmente**

**(más pruebas semanales de los cadáveres)**

**Desafíos:**

- Capacidad de muestreo
- Capacidad de diagnóstico

18

18

## Programa Piloto de Comparación de datos sobre la influenza aviar (AIM-Avian Influenza Matching)



### Alcance y objetivos

- La vacunación contra los virus de la influenza aviar altamente patógenos ya se utiliza en países donde los virus son endémicos.
- Las vacunas inactivadas son económicamente rentables, por lo que se espera que se utilicen ampliamente en la región.
- La heterogeneidad y la deriva antigénica pueden reducir la eficacia de las vacunas en la protección contra la enfermedad y la diseminación del virus de las aves infectadas.
- Proporcionar información a las partes interesadas sobre las características antigénicas de los virus de la influenza aviar que circulan actualmente puede servir para facilitar la selección de vacunas adecuadas para las aves de corral y utilizarse junto con otra información.
- Necesidad de un seguimiento en tiempo real de las actualizaciones de alerta temprana de las cepas de siembra de vacunas.

19

19

## Programa Piloto de Comparación de datos sobre la influenza aviar (AIM-Avian Influenza Matching)



- |             |   |
|-------------|---|
| Sueros      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Creación de un panel de sueros normalizados de aves de corral - <b>Diciembre de 2022</b></li> <li>• Aislados <i>similares</i> a cepas de siembra de vacunas y clado H5 2.3.4.4b</li> </ul> |
| HI          | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Selección de virus contemporáneos representativos - <b>Febrero de 2023</b></li> <li>• Caracterización antigénica armonizada</li> </ul>   |
| Cartografía | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cartografía de la caracterización antigénica - <b>Marzo de 2023</b></li> </ul>   |
| Informe     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Informe de síntesis que presenta la diversidad antigénica de los virus H5 que circulan actualmente</li> <li>• Compartido con las partes interesadas - <b>Abril de 2023</b></li> </ul>      |

20

20

## Programa Piloto de Comparación de datos sobre la Influenza Aviar (AIM-Avian Influenza Matching)



### Barreras

- Notificación temprana de los brotes
- Vigilancia
- Secuenciación de la información
- Intercambio de aislados virales

### Soluciones

- Refuerzo de redes como OFFLU
- Mejora de la capacidad de vigilancia y secuenciación genómica

21

21

### Programa Piloto de Comparación de datos sobre la Influenza Aviar

La Animal and Plant Health Agency (APHA, Reino Unido) y el Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe, Italia) están elaborando un panel de sueros de aves de corral y antígenos homólogos. Esto servirá como estándar de OFFLU para la caracterización antigénica de los virus de la gripe aviar que circulan actualmente. Esto permitirá evaluar la evolución de los virus de la influenza aviar entre los laboratorios de OFFLU de forma armonizada. Los resultados serán cartografiados antigénicamente por el Royal Veterinary College (RVC, Londres). Los paneles de sueros de referencia se compartirán con los socios para ampliar la representación geográfica. Los resultados permitirán un seguimiento continuo de los cambios antigénicos en los virus que circulan actualmente y servirán de base para la ampliación y actualización continuas de los paneles de sueros.



Food and Agriculture  
Organization of the  
United Nations



World Organisation  
for Animal Health  
Founded as OIE



22

22

Gracias por su atención



Gracias a Francesco Bonefante, David Suarez, Amelia Coggon, Guillermo Zavila y Les Sims por sus contribuciones a la presentación.

El sitio web de OFFLU contiene actualizaciones periódicas de las publicaciones de OFFLU y de sus organizaciones matrices, asesoramiento técnico, protocolos y muchos otros enlaces útiles. Para más información, visite: [www.offlu.org](http://www.offlu.org)

Para mayor información, póngase en contacto con: [secretariat@offlu.org](mailto:secretariat@offlu.org)