

Claves para la interpretación de resultados serológicos en avicultura

Juan Martín Etchegoyen
Médico Veterinario
GTA – Octubre 2016

Usos de la serología en avicultura

- Medir la respuesta inmune a vacunas (seroconversión y boosting).
- Establecer Líneas de base.
- Realizar perfiles serológicos de parvadas o Lotes.
- Detectar exposición a campo.
- Determinar ausencia de circulación viral.
- Detectar estados inmunodepresivos.
- Determinar el momento óptimo para vacunar (Gumboro).

Elementos a tener en cuenta

- Sensibilidad y Especificidad del método analítico.
- Validez del ensayo.
- Estadística descriptiva:
 - Tamaño de la muestra (n).
 - Media (Aritmética-Geométrica).
 - Desvío estándar (SD).
 - Coeficiente de variación (CV).

Validez del ensayo

- D.O. de los Controles positivos.
- D.O. de los Controles negativos.
- Diferencia entre Controles Positivos y Negativos.
 - Si el valor de los controles o la diferencia entre ellos están fuera del intervalo especificado, el ensayo no es válido, Se deberá revisar el procedimiento analítico antes de repetir la prueba.

Muestreo

Objetivo del análisis:

- Para determinar o establecer una condición.
(prevalencia muy baja o muy alta)
- Realizar perfiles serológicos y compararlos con las líneas de base.
- Con fines diagnósticos.

Tamaño de la muestra

- Al trabajar con muestras, usamos en primer término una estadística descriptiva, para luego si hacer inferencias sobre la población de la cual provienen.
- A menor prevalencia del parámetro buscado, mayor deberá ser el tamaño de la muestra, a fin de aumentar la probabilidad se encontrarlo.

Probabilidad vs. Prevalencia

Prevalencia	1 %	2%	3%	4%
n	p	P	P	p
5	4.8 %	9.2 %	13.3 %	17.0 %
10	9,1 %	16.7 %	22.8 %	27.7 %
15	13.0 %	22.6 %	29.4 %	33.9 %
20	16.5 %	27.2 %	33.6 %	36.8 %
25	19.6 %	30.8 %	36.1 %	37.5 %

Tamaño de la muestra

- A mayor variabilidad del parámetro evaluado, mayor deberá ser el tamaño de la muestra a fin de tener una confianza aceptable en nuestros inferencias.

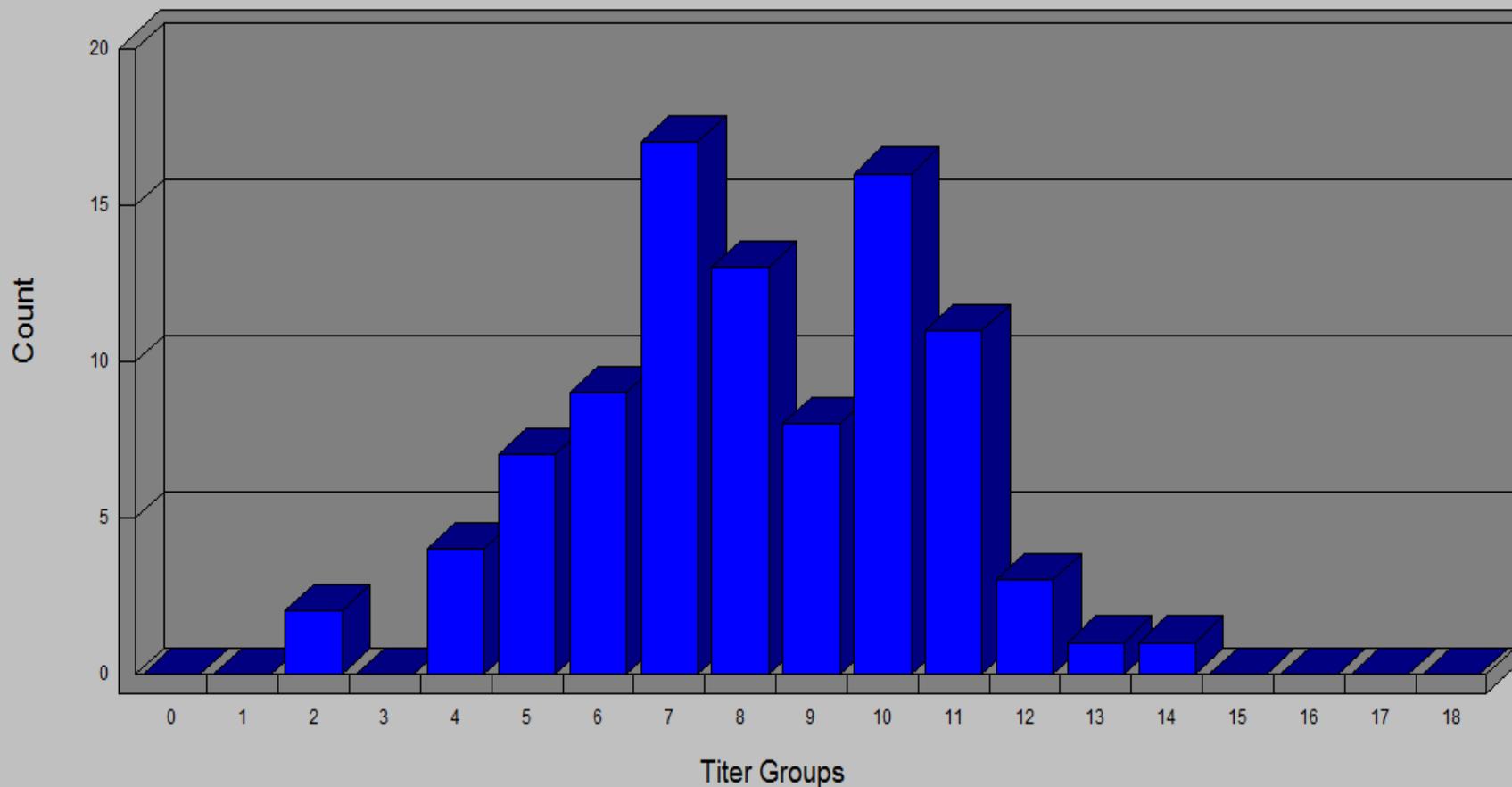
Población Normal

✓ xChek - [Graph: 6/26/2016-006-IBD]

File Edit View Database Reports Options Window Help



EJEMPLO B N=92 - IBD



P C
Options
Case Info
Recalc
Up
Down

A EJEMPLO B N=92 92

Ready with database C:\XCHEK\DEMO B.MDB

IBD Poultry Horiz

Muestras n=23

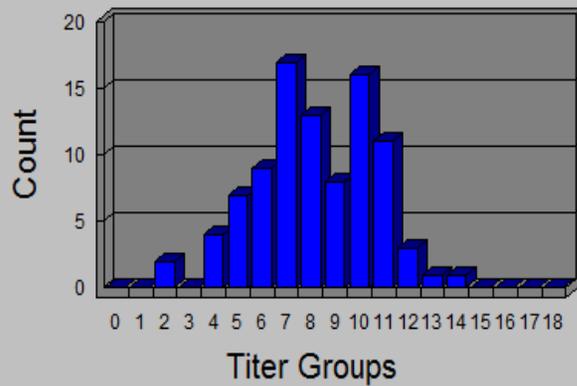
Población anormal

xChek - [Multiple Graphs]

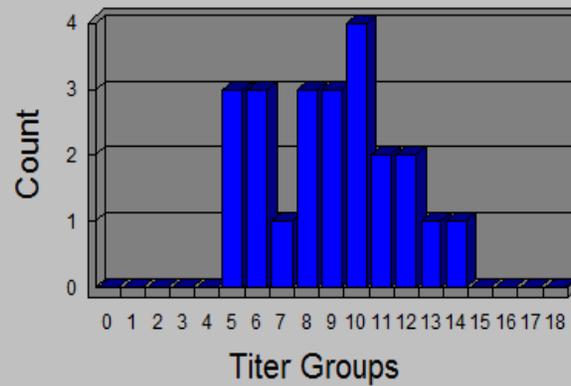
File Edit View Database Reports Options Window Help



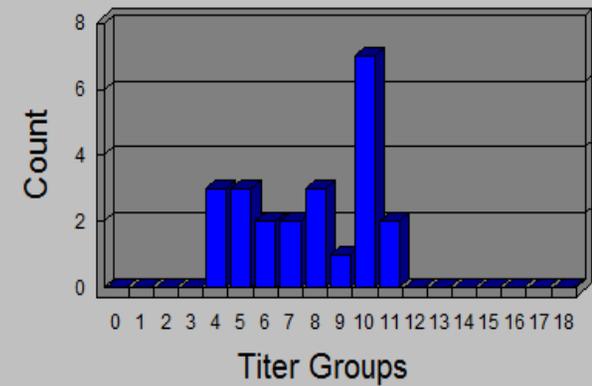
EJEMPLO 1B N=92 - IBD



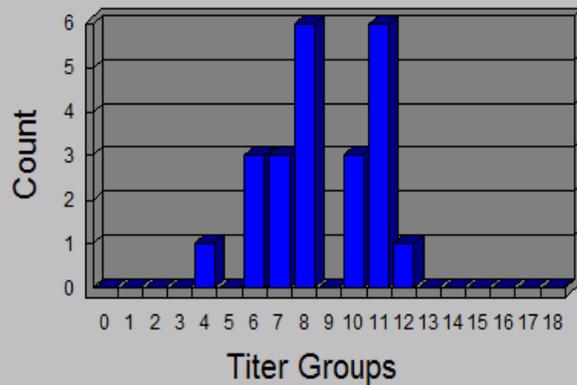
EJEMPLO B N=23 A - IBD



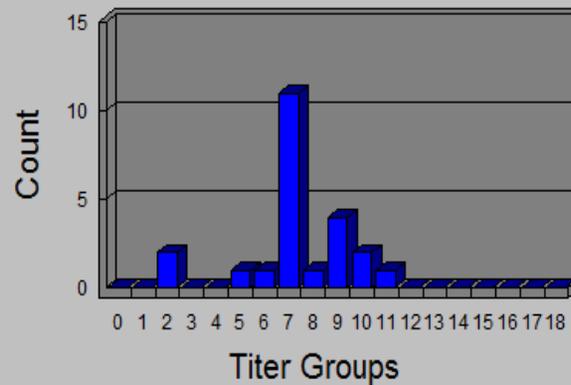
EJEMPLO B N=23 B - IBD



EJEMPLO B N=23 C - IBD



EJEMPLO B N=23 D - IBD



P C

Options

Case Info

Recalc

Up

Down

A	EJEMPLO 1B N=92	92	^
B	EJEMPLO B N=23 A	23	
C	EJEMPLO B N=23 B	23	v

Ready with database C:\XCHEK\DEMO B.MDB

IBD Poultry Horiz

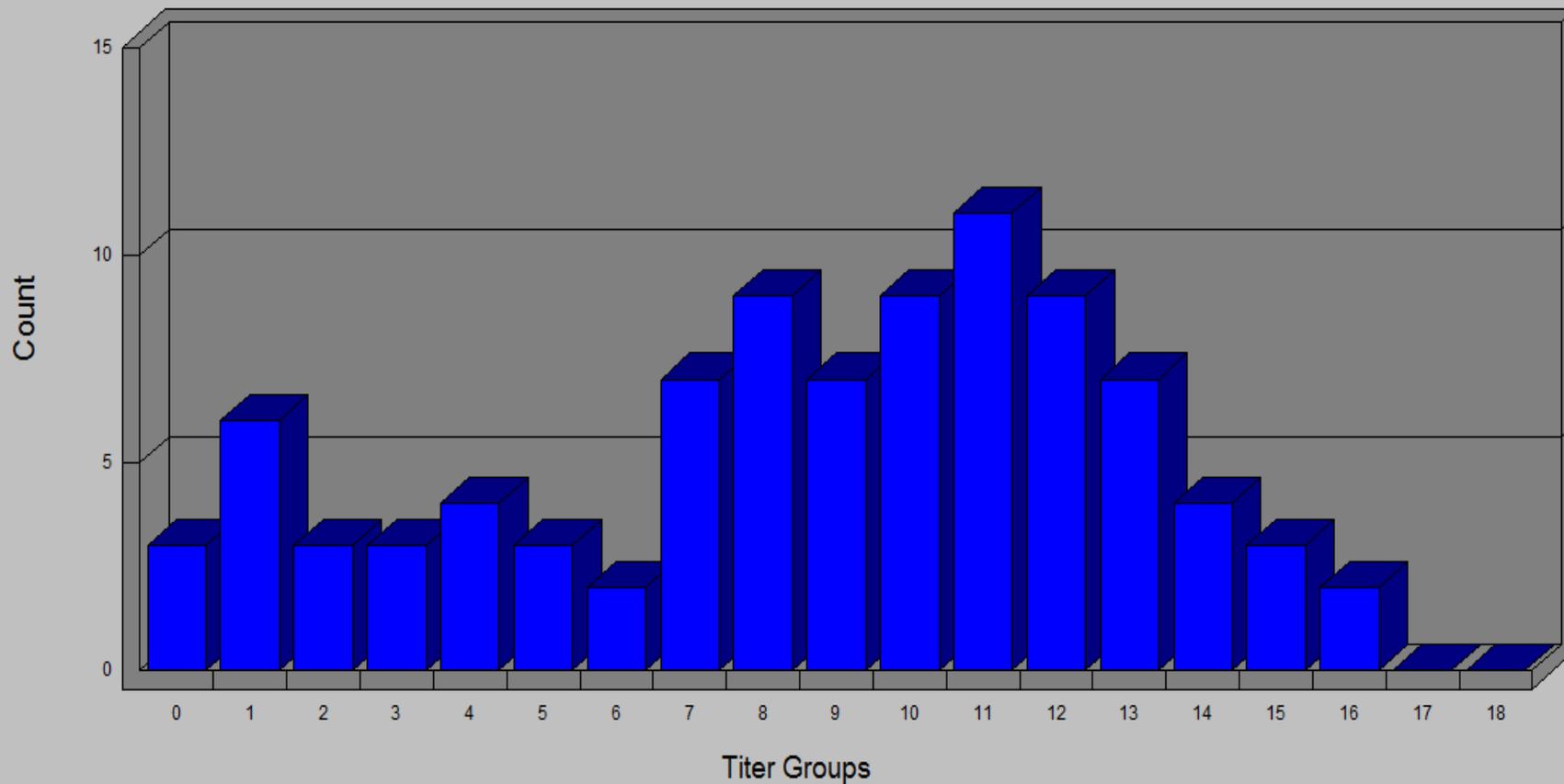
Población atípica (?)

xChek - [Graph: 6/26/2016-009-IBD]

File Edit View Database Reports Options Window Help



EJEMPLO C - IBD



P C
Options
Case Info
Recalc
Up
Down

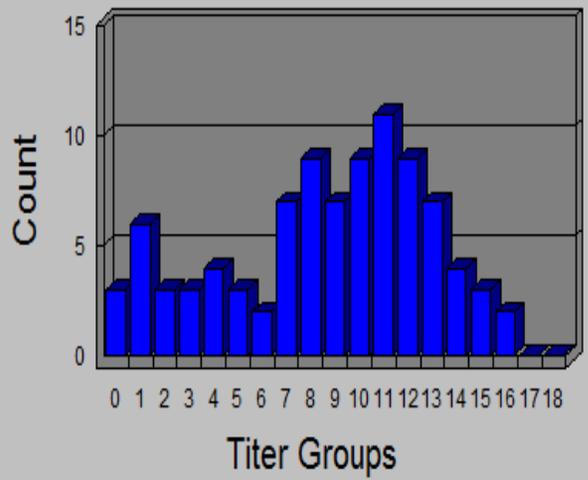
A EJEMPLO C 92

Ready with database C:\XCHEK\DEMO B.MDB

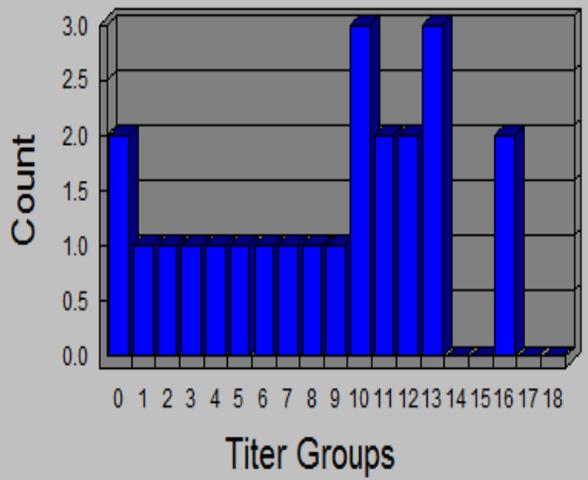
IBD Poultry Horiz



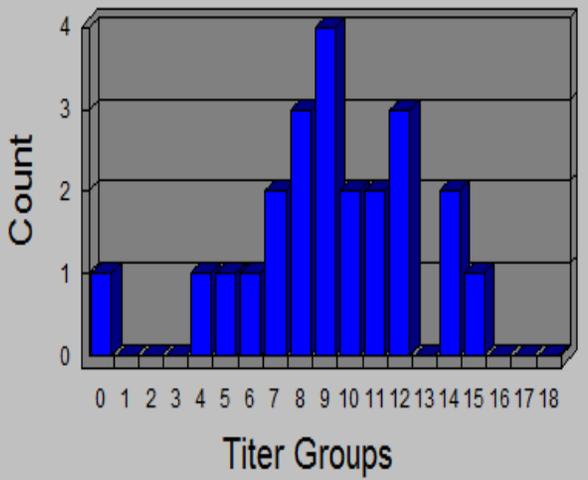
EJEMPLO C - IBD



EJEMPLO C N 23 A - IBD



EJEMPLO C N 23 B - IBD



P C

Options

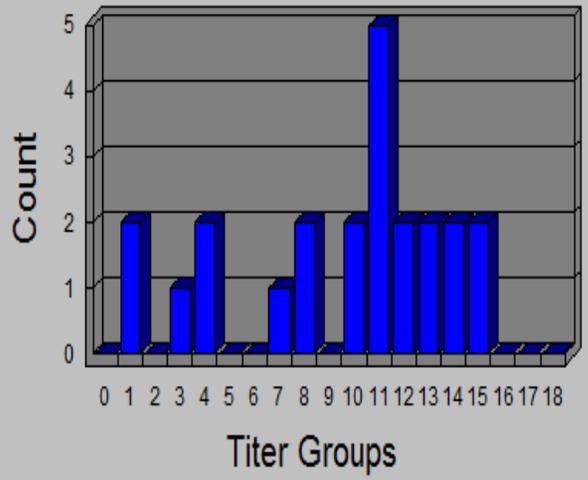
Case Info

Recalc

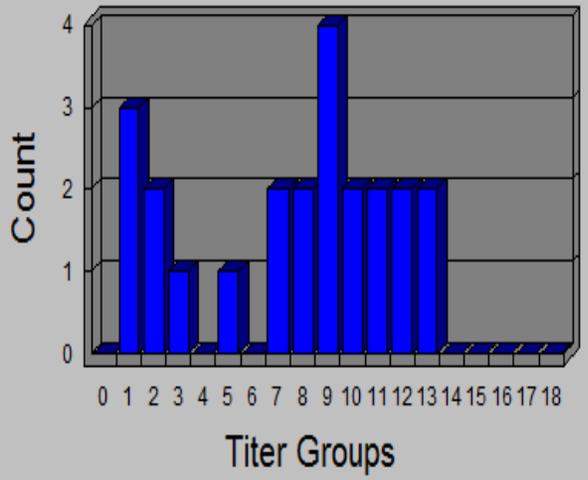
Up

Down

EJEMPLO C N 23 C - IBD



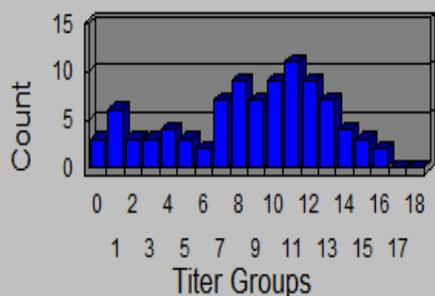
EJEMPLO C N 23 D - IBD



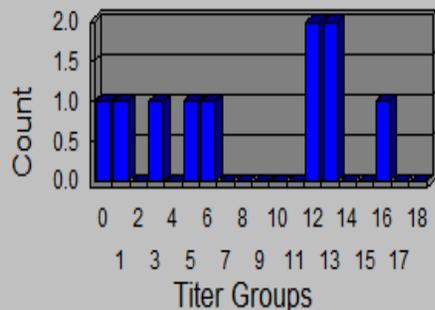
A	EJEMPLO C	92	^
B	EJEMPLO CN 23 A	23	
C	EJEMPLO CN 23 B	23	v



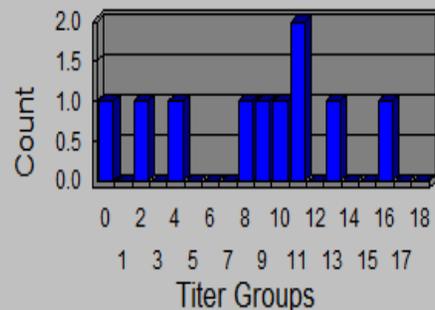
EJEMPLO C - IBD



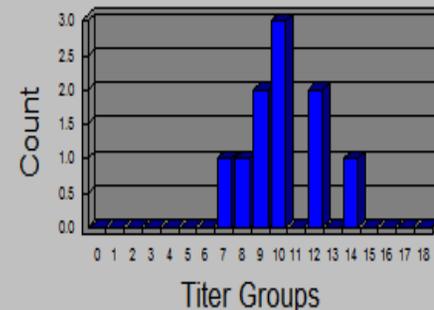
EJEMPLO C N 10 A - IBD



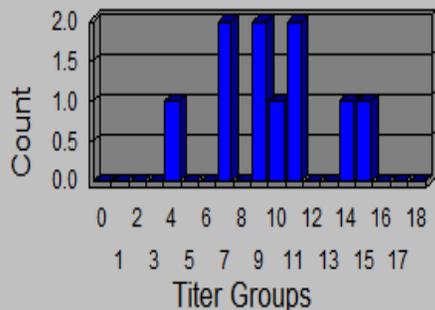
EJEMPLO C N 10 B - IBD



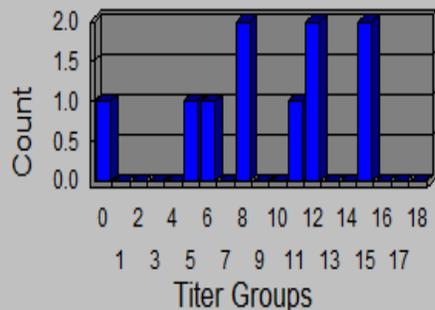
EJEMPLO C N 10 C - IBD



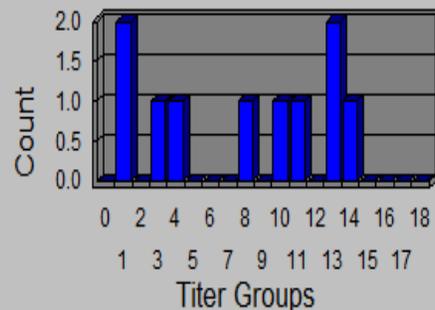
EJEMPLO C N 10 D - IBD



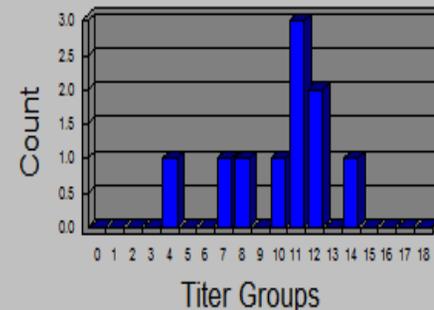
EJEMPLO C N 10 E - IBD



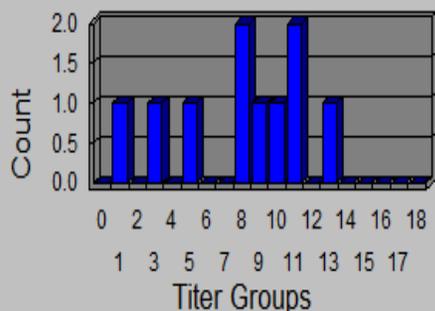
EJEMPLO C N 10 F - IBD



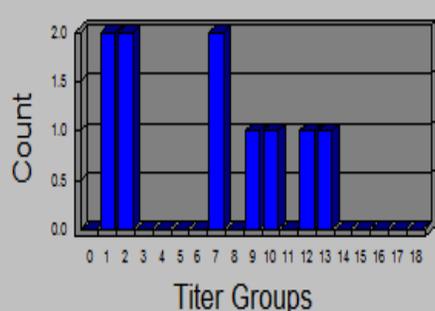
EJEMPLO C N 10 G - IBD



EJEMPLO C N 10 H - IBD



EJEMPLO C N 10 I - IBD



P C

Options

Case Info

Recalc

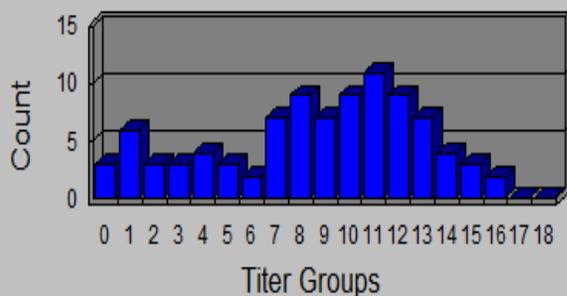
Up

Down

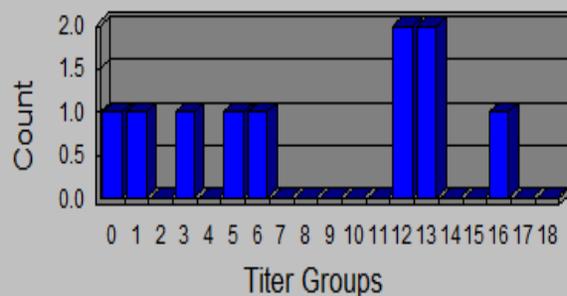
A	EJEMPLO C	92	^
B	EJEMPLO CN 10 A	10	
C	EJEMPLO CN 10 B	10	^



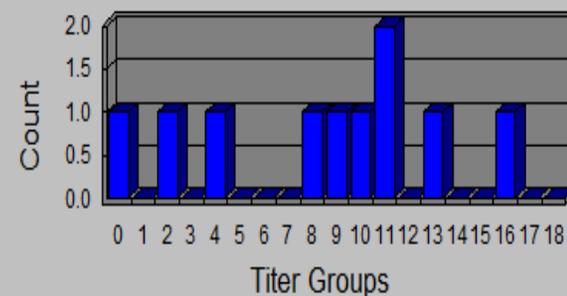
EJEMPLO C - IBD



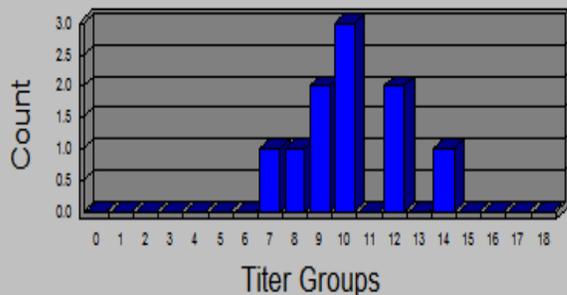
EJEMPLO C N 10 A - IBD



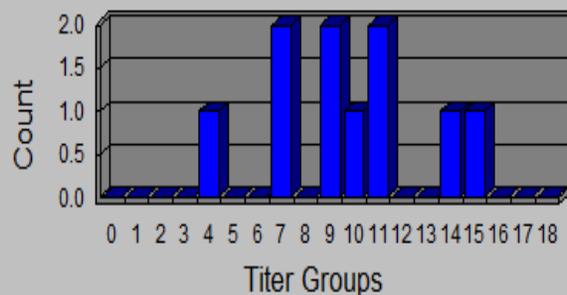
EJEMPLO C N 10 B - IBD



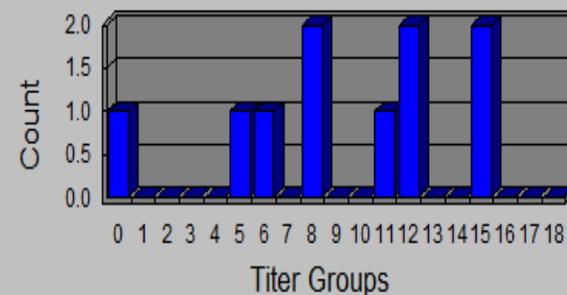
EJEMPLO C N 10 C - IBD



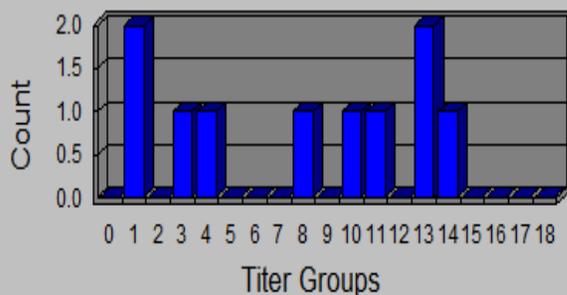
EJEMPLO C N 10 D - IBD



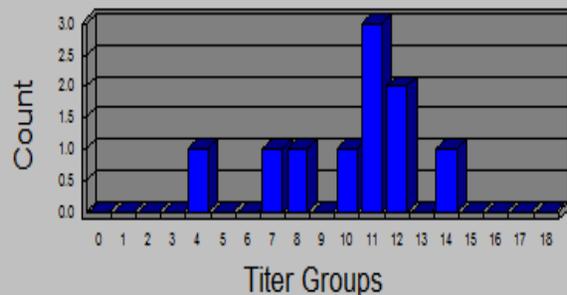
EJEMPLO C N 10 E - IBD



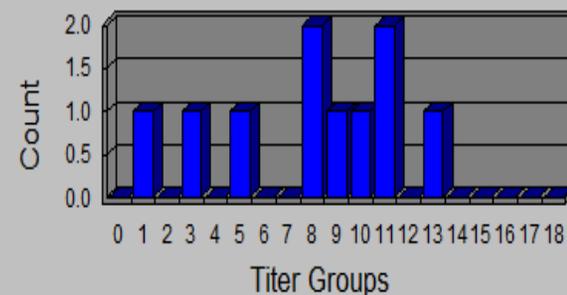
EJEMPLO C N 10 F - IBD



EJEMPLO C N 10 G - IBD



EJEMPLO C N 10 H - IBD



P C

Options

Case Info

Recalc

Up

Down

A	EJEMPLO C	92	^
B	EJEMPLO CN 10 A	10	
C	EJEMPLO CN 10 B	10	^

Muestreo

- En general se considera que 20-23 es un tamaño adecuado para un Lote o galpón.
- El muestreo debe ser aleatorio (excepto para diagnóstico), es decir todas las aves deben tener la misma probabilidad de ser elegidas.
- La aleatorización compensa los efectos de la varianza no controlable.

Efecto del tamaño de muestra

Tamaño de la Muestra	Titulo Promedio Minimo	CV (%)	Titulo Promedio Maximo	CV (%)
46	2872	47	2894	48
23	2406	42	3382	51
15	2105	32	4019	52
10	1069	23	3849	59

Estudio realizado por el Dr. T. Lester, Mississippi State University

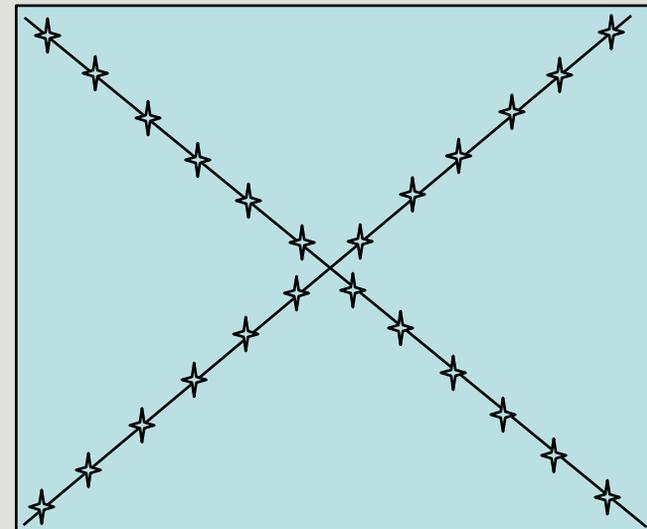
Efecto del tamaño de muestra

Muestras	CV (%) dentro del 20%	CV (%) por encima del 20%
46	100	0
23	100	0
15	66	33
10	56	44

Estudio realizado por el Dr. T. Lester, Mississippi State University

Métodos de muestreo aleatorio

- Método de la diagonal:
- Muestra tomada sobre dos diagonales trazadas en la parvada.
- Para muestrear 24 aves:
 - Seleccionar 12 aves en cada diagonal.
 - Seleccionar aves a intervalos regulares: p. ej. en una diagonal de 24 m, seleccione un ave cada 2 m.



✦ Tome muestras aquí

Métodos de muestreo aleatorio

- **Muestreo en baterías o jaulas:**
- Enumere las baterías/jaulas.
- Use un generador de números aleatorios para obtener 24 números al azar.
- Seleccione los números de las baterías/jaulas generados al azar.
- Muestree un ave de cada batería/jaula seleccionada.

Manipulación de las muestras

- La calidad de la muestra puede afectar los resultados del ensayo.
- Evite muestras excesivamente hemolizadas o extremadamente lipémicas.



Tome la muestra de esta zona

Manipulación de las muestras

- Remover el coágulo y conservar las muestras de suero a 2–4°C durante un máximo de 3–5 días.
- Conservar las muestras de suero congeladas a -20°C durante un máximo de 30 días.
- Evite congelar y descongelar repetidamente, no lo haga más de 3–5 veces.

Plan de monitoreo

Tipo de ave	Plan
Reproductoras	<ul style="list-style-type: none"><li data-bbox="730 492 1843 597">❑ Tomar muestras a los 3–4 días para medir niveles de anticuerpos maternos.<li data-bbox="730 662 1692 760">❑ <i>Para evaluar la respuesta inmunitaria a las vacunas:</i><ul style="list-style-type: none"><li data-bbox="835 833 1780 938">▪ Tomar muestras 3-4 semanas después de la vacunación con vacunas vivas,<li data-bbox="835 979 1728 1076">• Tomar muestras 6 semanas después de la vacunación con vacunas inactivas<li data-bbox="730 1117 1535 1279">❑ Tomar muestras a intervalos de 4-8 semanas Para realizar perfiles serológicos.

Plan de monitoreo

Tipo de ave	Plan
Gallinas ponedoras	<ul style="list-style-type: none"><li data-bbox="730 492 1843 597">❑ Tomar muestras a los 3–4 días para medir niveles de anticuerpos maternos.<li data-bbox="730 662 1692 760">❑ <i>Para evaluar la respuesta inmunitaria a las vacunas:</i><ul style="list-style-type: none"><li data-bbox="835 833 1780 938">▪ Tomar muestras 3-4 semanas después de la vacunación con vacunas vivas,<li data-bbox="835 979 1730 1076">• Tomar muestras 6 semanas después de la vacunación con vacunas inactivas<li data-bbox="730 1117 1535 1336">❑ Tomar muestras a intervalos de 4-8 semanas Para realizar perfiles serológicos (y compararlos con las líneas de base)

Plan de monitoreo

Tipo de ave	Plan
Pollos parrilleros	<ul style="list-style-type: none">○ Tomar muestras a los 3–4 días para medir las concentraciones de anticuerpos maternos.○ Tomar muestras a las 3-4 semanas, según el programa de vacunación y el riesgo de exposición en el campo.○ Tomar muestras antes del sacrificio hacia las 6 semanas de vida para evaluar la respuesta a las vacunas, inmunocompetencia y la posible exposición a campo.

Monitoreo

- Monitorear periódicamente las parvadas. Realizar perfiles serológicos y compararlos con las líneas de base.
- La línea de base variará según la línea genética, plan de vacunación y manejo.
- El título medio por sí sólo no es muy útil, a menos que conozcamos el grado de variabilidad (CV%) y los valores normales esperados.

Media Aritmética:

$$A = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n a_i$$

- Título medio de las aves analizadas = título aproximado de un ave promedio de una parvada.
- A mayor tamaño de la muestra, mayor confiabilidad del promedio.

Media Geométrica:

$$\left(\prod_{i=1}^n a_i \right)^{1/n} = \sqrt[n]{a_1 a_2 \cdots a_n}.$$

- Esta medida de resumen le quita peso a los valores extremos.

Desvío Standard:

$$s = \sqrt{\frac{1}{N - 1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}.$$

- Calcula el desvío promedio de los valores respecto de la media, en las unidades de origen,

Coeficiente de Variación:

$$CV \% = SD/A$$

- Calcula la variabilidad promedio, expresada en % de desviación de los valores respecto de la media.
- Una parvada con un valor bajo de CV (<40%) está formada por aves que presentan respuestas similares y uniformes.
- Una parvada con un valor elevado de CV (>40%) tiene más variabilidad de lo normal.

Variabilidad en los títulos

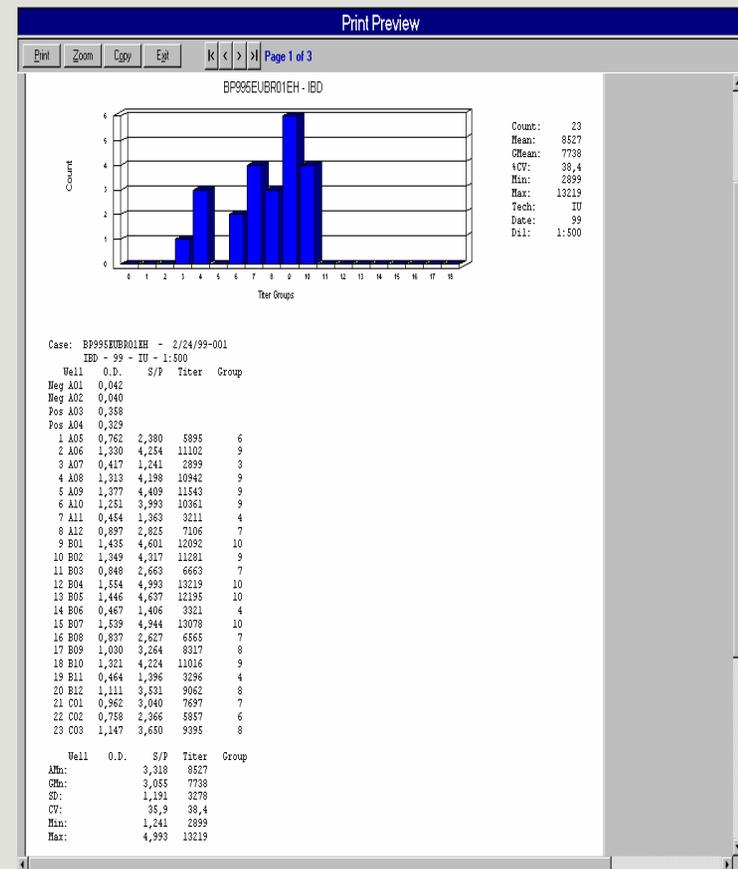
- Debido a la variabilidad propia del parámetro.
- Debido al Tamaño de la muestra.
- Debido a errores de técnica:
 - Muestreo, almacenamiento o manipulación inadecuados
 - Técnica de analítica inadecuada
 - Instrumentos inadecuados

xChek Software

- Permite monitorear el nivel de respuesta de la parvada a la vacunación.
- Permite determinar la concentración de anticuerpos maternos en los pollitos para seleccionar el momento óptimo para la vacunación.
- Permite realizar perfiles de anticuerpos en parvadas de reproductoras.
- Permite monitorear diferentes parvadas y comparar con las líneas de base.
- Permite determinar la naturaleza y el momento de la infección a campo.

xChek Software

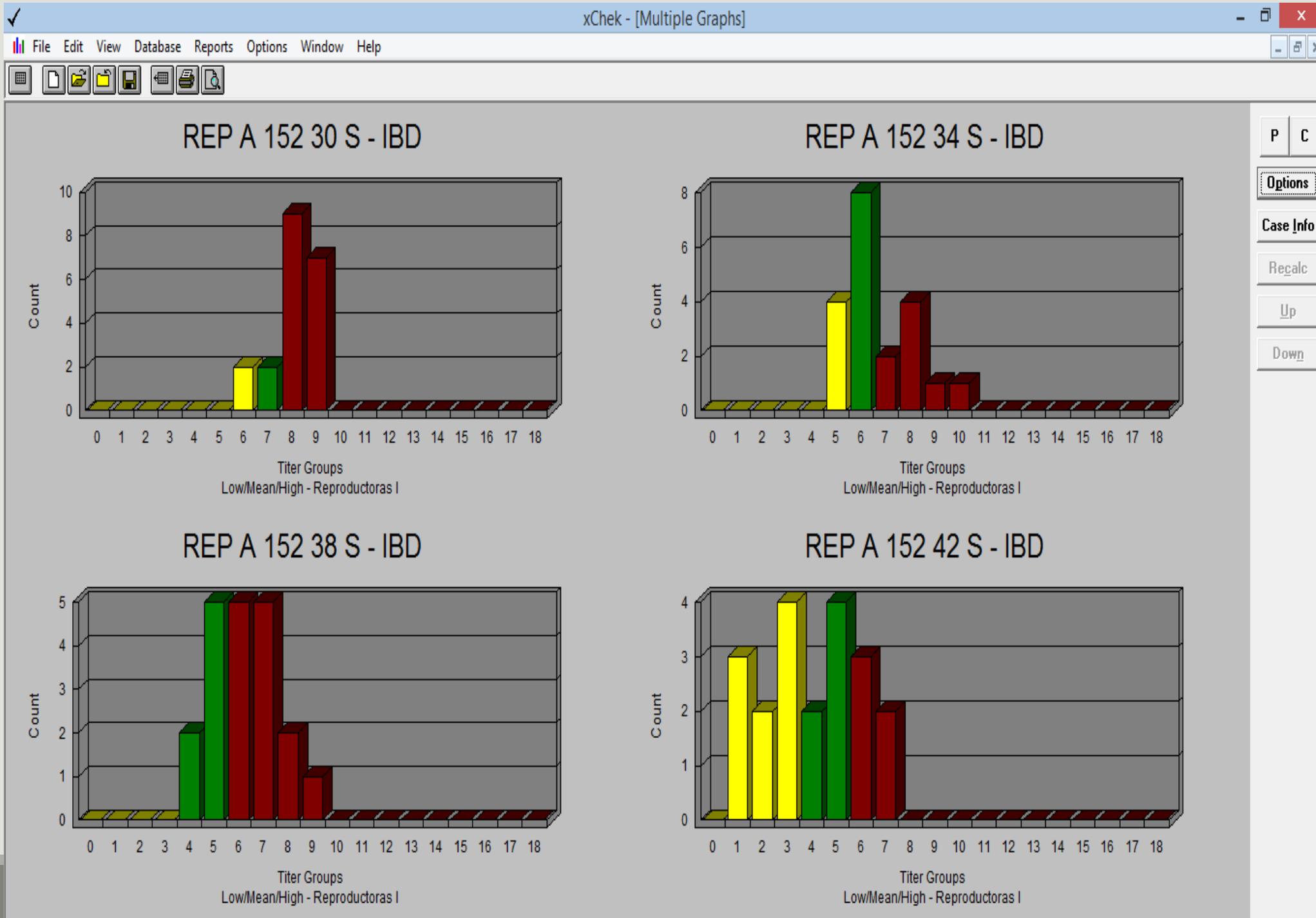
- Proporciona los siguientes parámetros estadísticos:
 - Número de muestras
 - Densidad óptica, relación S/P, título. grupo de título.
 - Media aritmética.
 - Media geométrica.
 - Desviación estándar.
 - Coeficiente de variación.



Establezca líneas de base

- La interpretación correcta de los resultados requiere de experiencia e idoneidad. El seguimiento y almacenamiento de los datos a lo largo del tiempo, resulta de gran ayuda.
- Realice seguimientos serológicos periódicos para determinar los valores de título (media y CV) y compararlos con los esperados (línea base) para el tipo de parvada, edad, plan de vacunas, entorno y manejo.
- Las desvíos con respecto a la línea de base son llamados de atención. Muchas veces detectan lo que no vemos clínicamente (desafíos, inmunosupresión, fallas vacunales).

Línea de base reproductoras



Línea de base reproductoras

xChek Print Preview

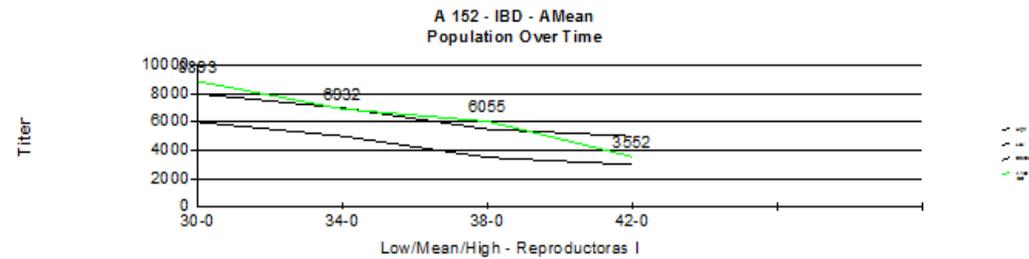
File

Print... 99% 1/1 Back Forward

IDEXX Laboratories, Inc.
Westbrook, ME 04092
USA
12/10/2014



Multiple Case Graphs



Code	Assay	Date	Count	A Mean	CV	Age	Case	Comment
A	IBD	19/01/11	20	8893	19,1	30-0	REP A 152 30 S	
B	IBD	19/01/11	20	6932	35,8	34-0	REP A 152 34 S	
C	IBD	19/01/11	20	6055	30,8	38-0	REP A 152 38 S	
D	IBD	19/01/11	20	3552	57,1	42-0	REP A 152 42 S	

Línea de base reproductores

xChek Print Preview

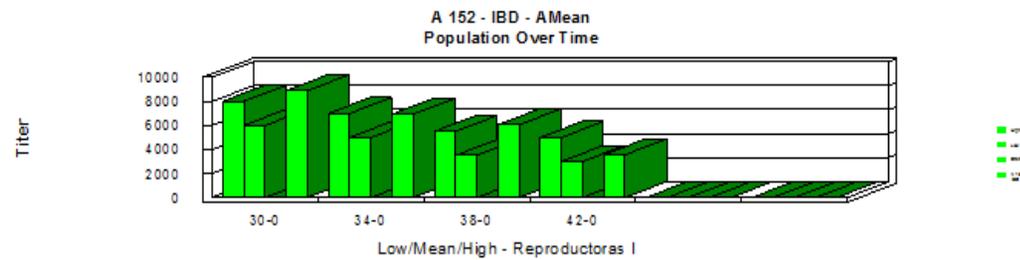
File

Print... 99% 1/1 Back Forward

IDEXX Laboratories, Inc.
Westbrook, ME 04092
USA
12/10/2014

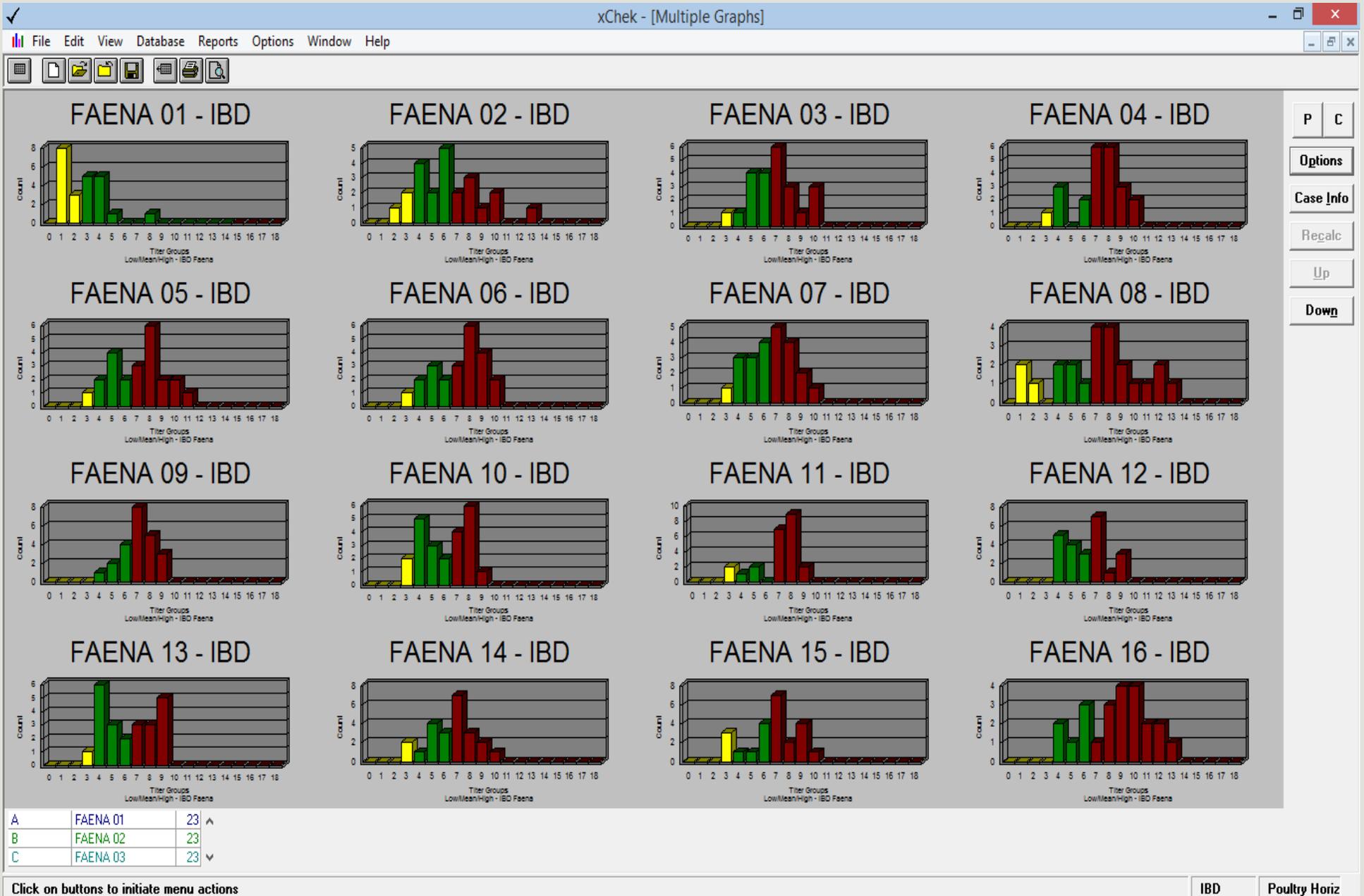


Multiple Case Graphs



Code	Assay	Date	Count	AMean	CV	Age	Case	Comment
A	IBD	19/01/11	20	8893	19,1	30-0	REP A 152 30 S	
B	IBD	19/01/11	20	6932	35,8	34-0	REP A 152 34 S	
C	IBD	19/01/11	20	6055	30,8	38-0	REP A 152 38 S	
D	IBD	19/01/11	20	3552	57,1	42-0	REP A 152 42 S	

Línea de base - faena parrilleros



Utilización de las líneas de base

- La línea de base es específica para la categoría, edad, plan vacunal etc.
- Los datos no son aplicables a otras parvadas, si el concepto.
- Compare los nuevos datos obtenidos con su línea de base.
- Valores de títulos altos indican exposición.
- Valores de títulos bajos pueden indicar una mala calidad de las vacunas, una administración inadecuada, o inmunosupresión.

Valores de referencia IDEXX (orientativo)

Ensayo	Tipo de vacuna	Titulo promedio (semanas tras la vacunación)	Titulo promedio Pollitos de un día
Encefalomiелitis aviar	Viva	3000–4000 (5–8 semanas)	—
Virus de la bronquitis infecciosa	Viva	1000–4000 (3-5 semanas)	—
	Inactivada	5000-16000 (5-8 semanas)	2000–6000
Enfermedad de la bursa	Viva	1000-4000 (3-5 semanas)	—
	Inactivada	4000-20000 (5-8 semanas)	3000–10000
Virus de la enfermedad de Newcastle	Viva	1000-4000 (3-5 semanas)	—
	Inactivada	10000-32000 (5-8 semanas)	5000–15000
REO	Viva	2000-4000 (3-5 semanas)	—
	Inactivada	4000-10000 (5-8 semanas)	3000–9000

Basada en dos dosis iniciales de vacuna viva y una dosis de refuerzo inactivada a las 16–18 semanas, dilución 1:500. Las concentraciones pueden variar en función del tipo de ave, del tipo de vacuna, del programa de vacunación etc.

Ejemplo: Seguimiento de un programa de vacunación

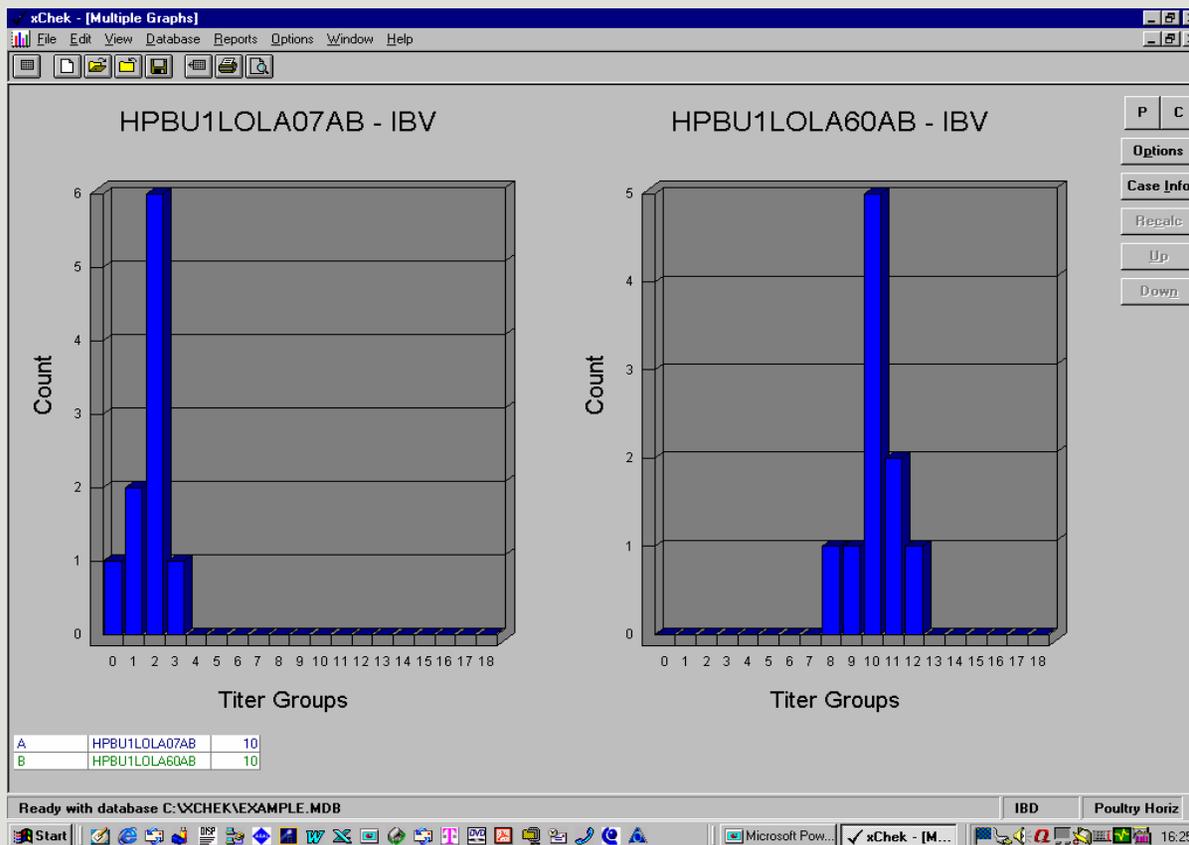


Gráfico de la izquierda:
Respuesta a la vacuna con ausencia o sólo una ligera exposición de campo

Gráfico de la derecha:
Respuesta a la vacuna con exposición de campo

Conclusiones:

- Emplee métodos de muestreo estadísticamente válidos.
- Utilice técnicas analíticas estandarizadas y una correcta manipulación de muestras.
- Establezca sus líneas de base.
- Adopte un plan de monitoreo.

¡Muchas gracias!