

Introducción

Validación de la idoneidad de las pruebas de detección de enfermedades inscritas en las listas de la OIE en el mudable panorama mundial de las tecnologías de diagnóstico

I.A. Gardner* ^(1, 2), A. Colling ^(2, 3), C.G. Caraguel ^(2, 4), J.R. Crowther ⁽⁵⁾, G. Jones ^(2, 6), S.M. Firestone ^(2, 7) y C. Heuer ^(2, 8)

- (1) Atlantic Veterinary College, University of Prince Edward Island, 550 University Avenue, Charlottetown, Prince Edward Island, C1A 4P3, Canadá
- (2) OIE Collaborating Centre for Diagnostic Test Validation Science in the Asia-Pacific Region, CSIRO Newcomb, CSIRO Australian Centre for Disease Preparedness, 5 Portarlington Road, Newcomb, Victoria 3219, Australia
- (3) Australian Centre for Disease Preparedness, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, 5 Portarlington Road, East Geelong, Victoria 3219, Australia
- (4) School of Animal and Veterinary Sciences, The University of Adelaide, Roseworthy Campus, Roseworthy, South Australia 5371, Australia
- (5) División Mixta FAO-OIEA de Técnicas Nucleares en la Alimentación y la Agricultura, Departamento de Ciencias y Aplicaciones Nucleares, Vienna International Centre, PO Box 100, A1400 Viena, Austria
- (6) School of Fundamental Sciences, Massey University, Palmerston North 4410, Nueva Zelanda
- (7) Melbourne Veterinary School, Faculty of Veterinary and Agricultural Sciences, The University of Melbourne, Victoria 3010, Australia
- (8) School of Veterinary Science, Massey University, Tennent Drive, Palmerston North 4410, Nueva Zelanda

*Autor encargado de la correspondencia: iagardner@upei.ca

Resumen

La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), con su labor de elaboración de normas y directrices que fundamentan el proceso de validación de pruebas para enfermedades de los animales terrestres y acuáticos, ha hecho aportaciones punteras a la disciplina científica que se ocupa de la validación de pruebas. En su *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres* y su *Manual de las Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos*, la OIE describe el procedimiento de validación de pruebas en clave de idoneidad para determinados propósitos, ahonda en la importancia de la sensibilidad y la especificidad diagnósticas (DSe y DSp) como medidas de la exactitud de una prueba y señala otros factores (como el costo de la prueba, la productividad del laboratorio o la rapidez de los resultados) que también influyen en la elección de una determinada prueba por delante de otras o en la inclusión de una nueva prueba en un proceso de diagnóstico que entraña el uso de varias. Los autores ofrecen ejemplos de cada uno de los seis principales propósitos con las que puede utilizarse una prueba, según vienen enunciados en el *Manual Terrestre*, y describen otros parámetros que es preciso tener en cuenta a la hora de validar pruebas practicadas en el punto de consulta, como la robustez o también la solidez (*ruggedness* en inglés; llamada a veces «robustez interlaboratorios»). También describen las dificultades ligadas a nuevas tecnologías y plataformas de diagnóstico. Se necesitan pruebas validadas y acompañadas de un cálculo de la DSe y la DSp para fines tan diversos e importantes como medir la confianza que merecen los resultados de pruebas para enfermedades inscritas en las listas de la OIE, facilitar la evaluación del riesgo ligado al desplazamiento de animales, estimar la prevalencia real, certificar la ausencia de enfermedad o realizar estudios epidemiológicos (factores de riesgo).

Palabras clave

Enfermedades animales – Especificidad – Exactitud de diagnóstico – Idoneidad para un propósito – Razón de verosimilitudes – Repetibilidad – Reproducibilidad – Sensibilidad – Validación de pruebas.

Introducción y panorámica histórica

La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), por medio de sus comisiones y sus laboratorios de referencia, lleva 30 años impulsando el progreso de la disciplina científica que se ocupa de la validación de pruebas, en particular estableciendo normas internacionales de validación. La norma suprema es el capítulo titulado «Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas» que figura tanto en el *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres (Manual Terrestre)* como en el *Manual de las Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos (Manual Acuático)* (1, 2), en el cual se describe un proceso de validación en cuatro etapas con medidas de la exactitud

analítica (véase, en este número, Bowden *et al.* [3]), la exactitud diagnóstica (véanse, en este número, Cullinane y Garvey [4] y Gifford *et al.* [5]) y la reproducibilidad de la prueba (véase, en este número, Waugh y Clark [6]). Los principios expuestos en el capítulo se aplican a las pruebas para enfermedades infecciosas de los animales, con independencia de que la patología en cuestión figure o no en las listas de la OIE. En el capítulo 2.2.7. del *Manual Terrestre* (7) y en otras publicaciones (8 y véase, en este número, Michel *et al.* [9]) se exponen modificaciones destinadas a salvar las numerosas dificultades que surgen a la hora de validar pruebas que se apliquen a enfermedades infecciosas de la fauna silvestre.

Durante el mismo período se han ido produciendo avances en las tecnologías de diagnóstico, en particular el uso de ensayos múltiples y la secuenciación de nueva generación (o «próxima generación») de importantes patógenos (10 y véase, en este número, Halpin *et al.* [11]), la creciente concepción de pruebas a pie de establo (en el punto de consulta) para diagnosticar rápidamente enfermedades animales importantes (véanse Halpin *et al.* [11], en este número, y [12]) o la aplicación de modelos de clases latentes para estimar la sensibilidad y la especificidad diagnósticas (DSe y DS_p) cuando el patrón o la prueba de referencia es imperfecto (13 y véase, en este número, Cheung *et al.* [14]). La OIE ha creado un registro de estuches de diagnóstico cuya eficacia analítica y diagnóstica ha sido evaluada y cuya «validez» para determinados fines certifica la OIE, en lo que constituye un ejemplo de iniciativa novedosa que varios países han replicado (véanse la sección de este artículo titulada «Aprobación y certificación de pruebas» y, en este número, el artículo de Gifford *et al.* [5] sobre la Secretaría de Registro de Estuches de Diagnóstico). Las responsabilidades del usuario final y el productor, por lo que respecta a la validación de estuches de prueba, han sido tratadas en una publicación anterior (15). La OIE, además, aprobó en 2017 la designación en la región de Asia y el Pacífico de un Centro Colaborador en Ciencias de la Validación de Pruebas de Diagnóstico como iniciativa conjunta del Centro Australiano de Preparación para Enfermedades (anteriormente denominado Laboratorio Zoonosológico Australiano) de la Organización de Investigaciones Científicas e Industriales del Commonwealth (CSIRO), la Facultad de Veterinaria y Agronomía de la Universidad de Melbourne y EpiCentre, entidad adscrita al Instituto de Ciencias Veterinarias y Biomédicas de la Universidad Massey (Nueva Zelanda). Este centro colaborador tiene por cometido «generar nuevos conocimientos y técnicas que mejoren el uso y la interpretación de las pruebas de diagnóstico empleadas en salud humana y sanidad animal y promover la difusión de este conocimiento entre todos los círculos médicos y veterinarios» (<https://fvas.unimelb.edu.au/research/centres/oie-dx>; véase también, en este número, Brown *et al.* [16]).

En este artículo introductorio se traza una panorámica de los progresos habidos en la validación de pruebas para las enfermedades inscritas en las listas de la OIE que afectan a animales terrestres

o a animales silvestres desde el punto de vista de su idoneidad para un determinado propósito (véanse, en este número, Cullinane [4] y Michel *et al.* [9] en relación con la fauna terrestre y la fauna silvestre, respectivamente). Un propósito claramente definido de la prueba, aunado al conocimiento de la patogénesis de la enfermedad, guiarán la selección de animales, muestras por analizar y dianas analíticas convenientes para incluirlos en el proceso de validación. Conviene recalcar que esta selección influye sobremanera en la exactitud de la mayoría de las pruebas de diagnóstico. Otro tanto cabe decir de los pasos previos al trabajo de laboratorio, como la obtención de muestras, el uso de conservantes, los tiempos de transporte o la manipulación de las muestras en el laboratorio receptor, sabiendo que la contaminación cruzada de muestras, ya sea sobre el terreno o en laboratorio, puede generar falsos resultados positivos (1, 7). Los laboratorios que practican pruebas de detección de enfermedades inscritas en las listas de la OIE deben operar conforme a un sistema de gestión de la calidad (17 y véase, en este número, Newberry y Colling [18]) y, de ser posible, participar en pruebas de competencia o pruebas interlaboratorios cuando se trate de enfermedades transfronterizas de importancia internacional (véanse, en este número, Waugh y Clark [6] y Johnson y Cabuang [19]). La cuestión del diseño, la realización y la comunicación de estudios de validación de pruebas está tratada en Gardner *et al.* (20) y otros artículos de este número temático (véanse, en este número, Kostoulas *et al.* [21] y Heuer y Stevenson [22]).

Validación e idoneidad para un propósito

La OIE considera «validada» una prueba para un patógeno o una enfermedad en concreto cuando estima que su exactitud y precisión analíticas y diagnósticas (repetibilidad y reproducibilidad) se ajustan al (los) propósito(s) previsto(s) en una determinada especie atendiendo a las muestras generalmente empleadas para la prueba y a los sistemas de diagnóstico en que se inscribe su utilización. El requisito de la validación se aplica tanto a las pruebas aplicadas a muestras individuales como al análisis de poblaciones o de mezclas de muestras de muchos animales. No hay una sola prueba que case perfectamente con todos los propósitos requeridos (algunos ensayos son más convenientes que otros para ciertos fines). Las pruebas aplicadas a los animales, por ejemplo, son imperfectas por lo que respecta a la DSe, a la DSp o a ambos parámetros, pero una prueba no tiene que ser perfecta para ser útil, sobre todo cuando es posible combinarla con otra u otras pruebas dirigidas contra un analito distinto (p.ej. detección de anticuerpos en suero y de ácidos nucleicos). Aunque la DSe, la DSp, la repetibilidad y la reproducibilidad son los criterios primordiales de evaluación, hay otras consideraciones anexas que son de interés para el usuario final, como el costo de la prueba, la productividad del laboratorio, la pericia del técnico y la calidad del instrumental (factores ambos que determinan la fiabilidad con que se efectúa la prueba) o el plazo de entrega de los resultados. Además, al considerar la probabilidad de que una prueba

validada vaya a ser realmente utilizada conviene tener en cuenta cuál puede ser el encaje de la técnica en cuestión con las pruebas ya existentes como parte de un proceso de diagnóstico. Aun cuando una prueba pueda haber sido validada y considerada idónea para cierto propósito por el laboratorio que la ha concebido o por un fabricante de estuches, cuando un nuevo laboratorio empiece a utilizar el ensayo validado habrá que proceder a nuevos estudios para verificar su exactitud y precisión (véase, en este número, Kirkland y Newberry [23]).

Las consecuencias de los errores analíticos (resultado falso negativo o falso positivo) pueden ser desde nimias hasta importantes en función de aspectos ligados al contexto de la prueba, como la unidad epidemiológica de interés (individuo, explotación, región, país...), la prevalencia de la enfermedad o la existencia o no de medidas eficaces de mitigación. Una prueba que arrojará a menudo falsos positivos, por ejemplo, sería inadecuada para demostrar la ausencia de infección en una población animal, pero quizá fuera aceptable para seleccionar ejemplares que van a ser desplazados, siempre y cuando presentase una DSe (sensibilidad diagnóstica) casi perfecta. Por lo que respecta a las técnicas cuyos resultados se miden en una escala cuantitativa, como el ensayo inmunoenzimático (ELISA) o la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (PCRc), es posible ajustar el valor de corte (umbral) para reducir el número de falsos positivos (esto es, obtener una mayor DSp) a costa de rebajar la DSe (24). Hay otras soluciones alternativas, como emplear una prueba que ofrezca una especificidad individual casi perfecta (es decir, superior al 99,9%) o recurrir al uso de dos o más pruebas con una interpretación seriada de los resultados (lo que significa que el resultado de todas las pruebas debe ser positivo para poder considerar positivo a un individuo, o a la inversa en el caso de los negativos).

Los «propósitos» de una prueba según la OIE

En su *Manual Terrestre* (cuadro I), la OIE distingue seis fines generales (que denomina «propósitos») a los que puede destinarse una prueba de diagnóstico. Además, en el formulario de la OIE de solicitud de registro y certificación de estuches de diagnóstico (véase, en este número, Gifford *et al.* [5] acerca de la SRDK [Secretaría de la OIE a cargo del registro de estuches de diagnóstico]) hay una opción de respuesta abierta en la casilla correspondiente al propósito (capítulo 2.2.3 del formulario). Así, cabe la posibilidad de marcar la casilla 7, «Otros», y especificar a continuación, por ejemplo, «Control de la infección de sementales y yeguas al inicio de la temporada reproductiva – Prueba de inmunofluorescencia indirecta para *Taylorella equigenitalis*». Por lo demás, cuando se efectúan pruebas en poblaciones de mamíferos silvestres suele ser para combatir una enfermedad o con fines de conservación (8). Los usos de una prueba con fines de pronóstico, como la «predicción» de un desenlace sanitario (p.ej. supervivencia o

muerte), son importantes en salud humana y al tratar a animales de compañía, pero la OIE no los contempla en este ámbito.

Es importante señalar que una prueba puede estar adaptada a más de un propósito si, para cada uno de los fines indicados, se presentan datos de evaluación apropiados. Aun cuando una prueba esté destinada a un solo propósito (p.ej. confirmación de casos clínicos sospechosos), es fundamental obtener correctamente las muestras de animales representativos de la población de origen con objeto de someter a prueba tejidos o líquidos en los que sea probable que esté presente el analito en cuestión. Por ejemplo, para fines de desplazamiento de animales vivos, una prueba que ofrezca gran sensibilidad para la detección de animales infectados que no presenten signos clínicos observables será de gran interés, pues la probabilidad de que animales que presenten un cuadro clínico sean trasladados o vendidos es considerablemente más baja. En el caso de muchas enfermedades, la sensibilidad diagnóstica de una misma prueba será inferior en animales sin signos clínicos que en los ejemplares que presenten signos concordantes con la enfermedad en cuestión. Por ejemplo, en un estudio de la exactitud de diagnóstico de una RT-PCRc que detecta el gen codificante de la proteína nuclear VP7 del virus de la peste equina, realizado con muestras sanguíneas de caballos que presentaban signos clínicos concordantes con la peste equina (esto es, fiebre y algún otro de los signos típicos de la enfermedad), se obtuvo una sensibilidad del 97,8% y una especificidad del 99,9% (29). En el momento del estudio no se habían detectado más que unos pocos caballos con infección asintomática en Sudáfrica (todos ellos previamente vacunados contra el virus de la peste equina). Por ello, en una ulterior evaluación cuantitativa del riesgo que presentaban caballos vivos exportados desde Sudáfrica realizada con la técnica de RT-PCRc evaluada por Guthrie *et al.* (29), se empleó una sensibilidad diagnóstica más baja, con un valor mediano del 91,4% (intervalo de confianza al 95%: 65,7% al 99,4%), para asegurar que hubiera un intervalo realista de valores de sensibilidad, aplicable a caballos con infección asintomática, cuando se utilizase la prueba para certificar la ausencia de infección por el virus en caballos trasladados entre países (30). Aun así, sin la validación del ensayo en caballos con infección asintomática el intervalo postulado podría haber sido excesivamente optimista.

Durante la vida de una prueba es posible que su finalidad cambie. Por ejemplo, cuando se empezaron a practicar pruebas de detección de la influenza aviar se empleaba el ensayo de PCR cuantitativa con sonda TaqMan A para confirmar la infección por virus de la influenza aviar en aves con signos clínicos sospechosos, pero con el paso del tiempo esta prueba también ha sido utilizada para detectar la infección en aves aparentemente sanas. La cuestión que se planteó era si la técnica TaqMan A seguía estando adaptada a su propósito. Por ejemplo: ¿genera suficiente confianza un resultado positivo (es decir, hay una probabilidad lo bastante baja de falsos positivos) al hacer pruebas de cribado en bandadas con una prevalencia baja o muy baja? En este ejemplo la

respuesta era «sí», pues la técnica presentaba una frecuencia muy baja de reacciones cruzadas, con lo que prácticamente no generaba falsos resultados positivos, y al mismo tiempo reaccionaba ante un espectro lo bastante amplio de cepas del virus de la influenza aviar.

En este número temático se presentan una serie de ejemplos y estudios de casos concretos, tanto en los mencionados artículos como en otro dedicado al uso de métodos serológicos y moleculares para estudiar aspectos epidemiológicos de la lengua azul y la peste equina (véase, en este número, Mayo *et al.* [31]). Los estudios aquí expuestos ejemplifican los distintos propósitos de una prueba definidos por la OIE y ponen el acento en los parámetros de rendimiento diagnóstico, como sensibilidad y especificidad diagnósticas o valores predictivos positivos y negativos (VPP y VPN), en las distintas fases de un brote (preclínica, clínica y posclínica/recuperación), incluido también el uso de múltiples pruebas. En algunos casos se explica también cómo proceder cuando se obtienen resultados no concluyentes o indeterminados: cabe, por ejemplo, analizar de nuevo las muestras u obtener nuevas muestras, según lo que prescriban o autoricen los procedimientos operativos normalizados o protocolos de laboratorio para el análisis ordinario de muestras, o efectuar sendos análisis de sensibilidad atribuyendo a los resultados dudosos ambos signos (positivo y negativo) alternadamente, como se hizo hace poco en Australia para evaluar datos serológicos referidos al virus de la enfermedad de la zarigüeya australiana (32).

Parámetros de exactitud de una prueba

La combinación de la DSe y la DS_p (o razón de verosimilitudes [RV], que va de cero a infinito) y los valores predictivos negativos (VPN) y valores predictivos positivos (VPP), que dependen de la prevalencia, son parámetros que ayudan a dirimir si el ensayo encaja con el propósito previsto en el caso de poblaciones con una prevalencia de infección «conocida» (recuadro 1). Cuando se trata de ensayos con una escala de medición continua, el área situada bajo la curva característica de funcionamiento del receptor (curva ROC) y la razón de verosimilitudes constituyen medidas alternativas de la exactitud de la prueba (33 y véase, en este número, Caraguel y Colling [34]).

En el siguiente ejemplo y en la figura 1 se muestran los efectos de la prevalencia en los valores predictivos (VPN y VPP). Cuando una campaña de erradicación es eficaz, cabe anticipar que en su transcurso se observe una disminución progresiva de la prevalencia de la enfermedad. A partir de ahí es de prever también que aumente el riesgo de que entre todos los resultados positivos de la prueba haya falsos positivos (lo que equivale a una disminución del VPP), a menos que la DS_p sea del 100%. Para elevar el VPP es útil emplear una prueba que ofrezca una DS_p elevada, recurrir a la interpretación seriada de dos o más resultados (de modo que un individuo solo sea considerado positivo si todos los resultados son positivos) o hacer uso de otro tipo de información (p.ej. la historia clínica) que incremente la prevalencia. El VPN, o porcentaje de resultados negativos

verdaderos respecto del total de resultados negativos, no se ve sensiblemente afectado cuando la prevalencia de infección es baja (p.ej. inferior al 10%). Para elevar el VPN puede ser de ayuda emplear una técnica con una DSe elevada o bien interpretar en paralelo dos o más resultados (de modo que un solo resultado positivo baste para considerar positivo al sujeto). Estos principios, que se aplican al individuo, pueden ser extendidos a otras unidades epidemiológicas (como rebaños o conglomerados de rebaños de una misma zona geográfica) (35).

A nivel de ejemplares individuales, la idoneidad de una determinada prueba viene dictada por las consecuencias de un falso resultado positivo o negativo según las circunstancias que rodeen el propósito previsto. Para un país exportador, por ejemplo, serán más preocupantes las consecuencias de un falso positivo cuando se trate de demostrar la ausencia de la enfermedad en cuestión de su población animal (propósito 1.a), por lo que preferirá una prueba o un algoritmo de diagnóstico que ofrezca valores elevados de DSp o RV+ (es decir, tratará de obtener el mayor VPP posible). Los países importadores, por su parte, desearán reducir al mínimo los falsos resultados negativos (esto es, trabajar con la mayor DSe posible). A nivel de población, una prueba adecuada para demostrar y mantener la condición de «libre de enfermedad» debería facilitar una amplia cobertura geográfica de poblaciones expuestas a riesgo y ofrecer rápidamente resultados con una buena relación costo-eficacia. Es importante señalar que para ninguna de estas pruebas la OIE tiene definido un umbral aceptable de exactitud (DSe, DSp, RV+, RV-, VPP y VPN) que pueda inclinar la balanza en favor de una u otra técnica, sabiendo además que la limitada precisión de los cálculos de la DSe y la DSp efectuados a partir de un solo estudio de evaluación supone un factor añadido de incertidumbre (cuadro I, 20).

Una limitación frecuente a la hora de validar pruebas de diagnóstico es la falta de muestras de referencia de animales probadamente infectados o no infectados, sobre todo en el caso de enfermedades que se dan con poca frecuencia o en una zona geográfica restringida o cuando el acceso a animales y muestras está reglamentado (como ocurre, por ejemplo, con las especies silvestres en peligro). De ahí que las estimaciones de la DSe y la DSp suelen acompañarse de amplios intervalos de confianza y presentar por ende escasa robustez desde el punto de vista estadístico. La OIE define un «reconocimiento provisional» para aquellos ensayos que se acompañen de estimaciones satisfactorias de la sensibilidad y especificidad analíticas (ASe, ASp) y de la repetibilidad y de estimaciones preliminares de la DSe, la DSp y la reproducibilidad. Por ejemplo: conseguir un número estadísticamente robusto de sueros de caballo infectado por el virus Hendra resulta complicado porque los caballos enfermos suelen morir o ser sacrificados antes de poder generar una respuesta de anticuerpos séricos. Por consiguiente, para evaluar un ELISA de detección de anticuerpos se empleó el suero de 19 caballos infectados y 477 caballos no infectados (36). Además, trabajando en red, se sometieron a prueba seis paneles de sueros bien caracterizados

para calcular la ASe, la ASp, la repetibilidad y la reproducibilidad, y los laboratorios integrantes de la red proporcionaron datos de referencia adicionales de caballos negativos para el virus, lo que deparó robustas estimaciones de la DS_p en poblaciones no infectadas. A la postre el ensayo fue aprobado por el subcomité de sanidad animal y normas de laboratorio (SCAHLs, por sus siglas en inglés), que es el organismo nacional de regulación australiano. El uso por una red de laboratorios de paneles de validación con muestras bien caracterizadas también aporta información útil sobre la exactitud y la precisión de una prueba (véanse, en este número, Ludi *et al.* [37] y Watson *et al.* [38]).

Evaluación y uso de pruebas en el punto de consulta y de nuevas tecnologías como PCR múltiple, secuenciación de nueva generación o marcadores biológicos (microARN)

Pruebas practicadas en el punto de consulta

Por lo común, las pruebas en el punto de consulta, también denominadas «pruebas a pie de establo», son practicadas sobre el terreno en condiciones variables de temperatura, humedad y luminosidad, con empleo de muestras de animales enfermos o muertos, y corren a cargo de técnicos con un nivel muy dispar de experiencia, formación y competencia. De ahí que, en el caso de estas pruebas, además de los requisitos generales de validación, sea necesario definir y analizar parámetros específicos, como la robustez o también la solidez (*ruggedness* en inglés, parámetro que da cuenta de la resistencia a la variación de factores externos) (véase, en este número, Halpin *et al.* [11]). Lo más probable es que las pruebas en el punto de consulta presenten una gran variabilidad de rendimiento, atribuible al dispar nivel de experiencia y competencia de los técnicos, y se apliquen a muestras de menor calidad que las que podrían enviarse a un laboratorio de diagnóstico. Si una de estas pruebas ha sido evaluada con hisopados orofaríngeos, por ejemplo, pero el técnico solo puede realizar hisopados cloacales, el resultado obtenido con la muestra en cuestión no será fiable. Idéntico problema se plantea con los hisopados para las pruebas de detección del virus de la COVID-19, pues muchos de los técnicos poseen una formación somera, los tipos de hisopo utilizados son distintos según los países o áreas administrativas y la zona de extracción de la muestra puede diferir (p.ej. zona nasal u orofaríngea). De igual modo, las condiciones de almacenamiento y el tiempo de vida útil de los reactivos y dispositivos de prueba, incluido el mantenimiento, pueden presentar mayor variación de la que habría en un laboratorio acreditado. Otra variable fundamental, que no es específica de las pruebas en el punto de consulta, pero reviste importancia y en general hay que tener en cuenta, es la fase de evolución clínica de la enfermedad en que está el animal analizado o, cuando se toman muestras *post-mortem*, el tiempo transcurrido desde la muerte. Buen ejemplo de ello lo ofrece la validación de la prueba de

inmunocromatografía para el carbunco bacteridiano que se emplea sobre el terreno para orientar el diagnóstico y las medidas de lucha en espera de la confirmación de laboratorio. Está comprobado que esta prueba ofrece niveles muy elevados de DSe y DSp cuando se utiliza dentro de las 48 horas siguientes a la muerte del animal. Se ha observado que la DSe, que es de un 93% en muestras obtenidas dentro de las 48 horas siguientes a la muerte, decrece sensiblemente, hasta un 56%, pasado este tiempo (39), hecho que determina las recomendaciones sobre el empleo de este ensayo sobre el terreno (40). En resumidas cuentas, en el estudio de validación de una prueba practicada en el punto de consulta será preciso evaluar la influencia de variables físicas como la radiación, la exposición a luz solar directa, la humedad, la temperatura, la presencia de polvo o barro o los procedimientos de obtención de muestras, entre otras, pues estas marcarán el grado de idoneidad de la prueba para el propósito previsto. Cuando sea probable que una prueba en el punto de consulta vaya a ser empleada después de la fecha de caducidad o con muestras de calidad dudosa, será importante contar con información detallada sobre su robustez frente a la variación de parámetros meteorológicos y de otro tipo y sobre las probables consecuencias de tales variaciones.

A la hora de validar pruebas en el punto de consulta es preciso determinar la variación que presenta una prueba al ser practicada tanto por un mismo técnico en distintas ocasiones como por técnicos diferentes, dentro de un espectro de condiciones realistas. Los resultados ayudarán a determinar la robustez, o resistencia a la variación de factores internos (repetibilidad), y la solidez, o resistencia a la variación de factores externos como las condiciones meteorológicas o niveles dispares de competencia (reproducibilidad). Para evaluar y vigilar la fiabilidad, es importante incorporar controles internos de calidad que confirmen el funcionamiento básico del dispositivo de prueba, por ejemplo una muestra débilmente positiva (para comprobar la DSe del aparato y evitar falsos negativos), un control negativo (para asegurarse de que los reactivos no presenten contaminación que genere falsos positivos) y, cuando se trate de un ensayo de detección de ácidos nucleicos, un control interno para detectar la presencia de inhibidores de la matriz (12).

Durante la reciente pandemia de COVID-19, la Universidad Johns Hopkins creó una página web con información obtenida de la evaluación de pruebas de diagnóstico aplicadas en el punto de consulta. La mayoría de los estuches evaluados eran pruebas en el punto de consulta que combinaban la detección de IgG y de IgM y habían pasado por un somero proceso de validación (comparación de su rendimiento con el de pruebas moleculares clásicas). Como las pruebas serológicas, en su mayor parte, no empiezan a ser reactivas hasta 5 a 7 días después de la infección, pueden dar resultado negativo cuando las pruebas moleculares arrojan resultado positivo, dado que cada técnica apunta a dianas distintas. En contraste, cabe prever que las pruebas serológicas arrojen un elevado número de resultados que en apariencia serán «falsos positivos» (más de 2 semanas

después de la aparición de signos clínicos) porque las pruebas moleculares pueden dar resultado negativo cuando las serológicas son positivas. En tal situación, conviene interpretar el resultado de los ensayos serológicos como señal de exposición al virus de la COVID-19. Por lo demás, la descripción de los usos y propósitos de las pruebas practicadas en el punto de consulta pone de relieve que los eventuales usuarios no siempre conocen cabalmente los principios de diagnóstico y la epidemiología de la COVID-19 (41).

Otras tecnologías

Tecnologías y aplicaciones como la secuenciación de nueva generación (o «de próxima generación»), la PCR en cartucho, la amplificación isotérmica mediada por bucles, las técnicas de bloqueo (*knock-out*) de genes (CRISPR) o los microARN, entre otras, están reduciendo ahora la distancia entre el laboratorio de investigación y el de diagnóstico. Es importante definir la posible utilidad y finalidad diagnósticas que pueden tener estos métodos modernos en los laboratorios de diagnóstico veterinario y estudiar su compatibilidad con los vigentes principios y métodos de validación de la OIE. Los parámetros esenciales de evaluación y control de calidad (parámetros de calidad) deben estar adaptados específicamente a la finalidad del proceso (10). Dado que muchas de estas modernas tecnologías presentan mayor exactitud y precisión que los métodos existentes, no se recomienda emplear un patrón de referencia para su validación. En tales casos es más conveniente recurrir a modelos bayesianos de clases latentes porque estos no dependen de un patrón de referencia perfecto (12 y véanse, en este número, Halpin *et al.* [11] y Cheung *et al.* [14]).

Aprobación y certificación de pruebas

Hay organismos de reglamentación que se ocupan de los procesos de registro de estuches de diagnóstico tanto en los países como a escala regional o mundial. La OIE, por ejemplo, tiene instituido un proceso científicamente fundamentado de validación, certificación y registro por el cual han sido registrados 14 estuches (véase, en este número, Gifford *et al.* [5]). El uso de formularios de validación baliza el proceso, propicia la transparencia y facilita una evaluación objetiva de los datos. Australia dispone de un proceso similar por el cual han sido aprobados 17 ensayos, aunque en él se utilizan formularios adaptados específicamente a las pruebas moleculares y serológicas. El Instituto Friedrich Loeffler de Alemania emplea formularios de solicitud para la concesión de licencia a lotes de reactivos y estuches de diagnóstico (lista de productos certificados). Toda vez que las pruebas se emplean en diferentes regiones o países, la falta de reconocimiento recíproco entre los organismos de reglamentación supone un problema para los fabricantes de estuches, dada la gran disparidad existente en cuanto a costos y nivel de exigencia. Hace falta una mayor armonización de los requisitos reglamentarios que se aplican a las pruebas de diagnóstico humano y veterinario, sobre todo en lo tocante a las enfermedades zoonóticas (42).

Cuando se introducen cambios en un ensayo (sustitución de reactivos gastados por un nuevo lote, modificaciones o mejoras técnicas o biológicas, etc.), es posible que se requiera un estudio comparativo de métodos para comprobar que no haya mermado el rendimiento de la prueba (43). Cuando un estuche de prueba ya desarrollado y validado vaya a ser utilizado por un nuevo laboratorio será preciso verificarlo de nuevo para comprobar que se cumplan las correspondientes especificaciones (23).

Referencias

1. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (2019). – Capítulo 1.1.6. Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas. *En Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres*, 8ª ed. OIE, París, Francia. Disponible en: www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/1.01.06_Validaci%C3%B3n.pdf (fecha de consulta: 6 de octubre de 2020).
2. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (2019). – Capítulo 1.1.2. Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas. *En Manual de Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos*, 7ª ed. OIE, París, Francia. Disponible en: www.oie.int/index.php?id=2439&L=2&htmfile=chapitre_validation_diagnostics_assays.htm (fecha de consulta: 6 de octubre de 2020).
3. Bowden T.R., Crowther J.R. y Wang J. (2021). – Review of critical factors affecting analytical characteristics of serological and molecular assays. *En La ciencia de la validación de pruebas de diagnóstico, elemento clave para la detección y el control eficaces de enfermedades animales infecciosas* (A. Colling & I.A. Gardner, coords.). *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 40 (1), XXX–YYY. doi:10.20506/rst.40.1.XXXX.
4. Cullinane A. y Garvey M. (2021). – A review of diagnostic tests recommended in the World Organisation for Animal Health *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. *En La ciencia de la validación de pruebas de diagnóstico, elemento clave para la detección y el control eficaces de enfermedades animales infecciosas* (A. Colling & I.A. Gardner, coords.). *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 40 (1), XXX–YYY. doi:10.20506/rst.40.1.XXXX.
5. Gifford G., Szabo M., Hibbard R., Mateo D., Colling A., Gardner I. y Erlacher-Vindel E. (2021). – Validation, certification and registration of certified tests and regulatory control of veterinary diagnostic test kits. *En La ciencia de la validación de pruebas de diagnóstico, elemento clave para la detección y el control eficaces de enfermedades animales infecciosas* (A. Colling &

I.A. Gardner, coords.). *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **40** (1), XXX–YYY. doi:10.20506/rst.40.1.XXXX.

6. Waugh C. y Clark G. (2021). – Factors affecting test reproducibility among laboratories. *En La ciencia de la validación de pruebas de diagnóstico, elemento clave para la detección y el control eficaces de enfermedades animales infecciosas* (A. Colling & I.A. Gardner, coords.). *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **40** (1), XXX–YYY. doi:10.20506/rst.40.1.XXXX.

7. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (2019). – Capítulo 2.2.7. Principios y métodos para la validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas aplicables a la fauna salvaje. *En Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres*, 8ª ed. OIE, París, Francia. Disponible en: www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.02.07_WILDLIFE.pdf (fecha de consulta: 6 de octubre de 2020).

8. Jia B., Colling A., Stallknecht D.E., Blehert D., Bingham J., Crossley B., Eagles D. y Gardner I.A. (2020). – Validation of laboratory tests for infectious diseases in wild mammals: review and recommendations. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **32** (6), 776–792. doi:10.1177/1040638720920346.

9. Michel A.L., van Heerden H., Prasse D., Rutten V., Al Dahouk S. y Crossley B.M. (2021). – Pathogen detection and disease diagnosis in wildlife: challenges and opportunities. *En La ciencia de la validación de pruebas de diagnóstico, elemento clave para la detección y el control eficaces de enfermedades animales infecciosas* (A. Colling e I.A. Gardner, coords.). *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **40** (1), XXX–YYY. doi:10.20506/rst.40.1.XXXX.

10. Van Borm S., Wang J., Granberg F. y Colling A. (2016). – Next-generation sequencing workflows in veterinary infection biology: towards validation and quality assurance. *En La genómica de patógenos y sus posibles aplicaciones* (P.R. Murcia, M. Palmarini & S. Belák, coords.). *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **35** (1), 67–81. doi:10.20506/rst.35.1.2418.

11. Halpin K., Tribolet L., Hobbs E.C. y Singanallur N. Perspectives and challenges in validating new diagnostic technologies. *En La ciencia de la validación de pruebas de diagnóstico, elemento clave para la detección y el control eficaces de enfermedades animales infecciosas* (A. Colling & I.A. Gardner, coords.). *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **40** (1), XXX–YYY. doi:10.20506/rst.40.1.XXXX.

12. Bath C., Scott M. [...] y Rodoni B. (2020). –Further development of a reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for the detection of foot-and-mouth

disease virus and validation in the field with use of an internal positive control. *Transbound. Emerg. Dis.*, preimpresión, 13 pp. doi:10.1111/tbed.13589.

13. Johnson W.O., Jones G. y Gardner I. (2019). – Gold standards are out and Bayes is in: implementing the cure for imperfect reference tests in diagnostic accuracy studies. *Prev. Vet. Med.*, **167**, 113–127. doi:10.1016/j.prevetmed.2019.01.010.

14. Cheung A., Dufour S., Jones G., Kostoulas P., Stevenson M.A., Singanallur N.B. y Firestone S.M. (2021). – Bayesian latent class analysis when there is an imperfect reference test. *En La ciencia de la validación de pruebas de diagnóstico, elemento clave para la detección y el control eficaces de enfermedades animales infecciosas* (A. Colling & I.A. Gardner, coords.). *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **40** (1), XXX–YYY. doi:10.20506/rst.40.1.XXXX.

15. Crowther J.R., Unger H. y Viljoen G.J. (2006). – Aspects of kit validation for tests used for the diagnosis and surveillance of livestock diseases: producer and end-user responsibilities. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **25** (3), 913–935. doi:10.20506/rst.25.3.1706.

16. Brown I., Slomka M.J., Cassar C.A., Mcelhinney L.M. y Brouwer A. (2021). – Diagnostic test validation science: a key element for effective detection and control of infectious animal diseases. *En La ciencia de la validación de pruebas de diagnóstico, elemento clave para la detección y el control eficaces de enfermedades animales infecciosas* (A. Colling & I.A. Gardner, coords.). *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **40** (1), XXX–YYY. doi:10.20506/rst.40.1.XXXX.

17. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (2019). – Capítulo 1.1.5. Gestión de calidad en los laboratorios de pruebas veterinarias. *En Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres*, 8ª ed. OIE, París, Francia. Disponible en: https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/1.01.05_Gesti%C3%B3n_calidad.pdf (fecha de consulta: 8 de octubre de 2020).

18. Newberry K. y Colling A. (2021). – Quality standards and guidelines for test validation for infectious diseases in veterinary laboratories. *En La ciencia de la validación de pruebas de diagnóstico, elemento clave para la detección y el control eficaces de enfermedades animales infecciosas* (A. Colling & I.A. Gardner, coords.). *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **40** (1), XXX–YYY. doi:10.20506/rst.40.1.XXXX.

19. Johnson P. y Caguang L. (2021). – Proficiency testing and ring trials. *En La ciencia de la validación de pruebas de diagnóstico, elemento clave para la detección y el control eficaces de enfermedades animales infecciosas* (A. Colling & I.A. Gardner, coords.). *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **40** (1), XXX–YYY. doi:10.20506/rst.40.1.XXXX.

20. Gardner I.A., Colling A. y Greiner M. (2019). – Design, statistical analysis and reporting standards for test accuracy studies for infectious diseases in animals: Progress, challenges and recommendations. *Prev. Vet. Med.*, **162**, 46–55. doi:10.1016/j.prevetmed.2018.10.023.
21. Kostoulas P., Gardner I.A., Elschner M.C., Denwood M.J., Meletis E. y Nielsen S.S. (2021). – Examples of proper reporting for evaluation (Stage 2 validation) of diagnostic tests for diseases listed by the World Organisation for Animal Health. *En La ciencia de la validación de pruebas de diagnóstico, elemento clave para la detección y el control eficaces de enfermedades animales infecciosas* (A. Colling & I.A. Gardner, coords.). *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **40** (1), XXX–YYY. doi:10.20506/rst.40.1.XXXX.
22. Heuer C. y Stevenson M.A. (2021). – Diagnostic test validation studies when there is a perfect reference standard. *En La ciencia de la validación de pruebas de diagnóstico, elemento clave para la detección y el control eficaces de enfermedades animales infecciosas* (A. Colling & I.A. Gardner, coords.). *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **40** (1), XXX-YYY. doi:10.20506/rst.40.1.XXXX.
23. Kirkland P.D. y Newberry K.M. (2021). – Your assay has changed – is it still ‘fit for purpose’? What evaluation is required? *En La ciencia de la validación de pruebas de diagnóstico, elemento clave para la detección y el control eficaces de enfermedades animales infecciosas* (A. Colling & I.A. Gardner, coords.). *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **40** (1), XXX-YYY. doi:10.20506/rst.40.1.XXXX.
24. Caraguel C.G.B., Stryhn H., Gagné N., Dohoo I.R. y Hammell K.L. (2011). – Selection of a cutoff value for real-time polymerase chain reaction results to fit a diagnostic purpose: analytical and epidemiologic approaches. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **23** (1), 2–15. doi:10.1177/104063871102300102.
25. Kirkland P.D. y Delbridge G. (2011). – Use of a blocking ELISA for antibodies to equine influenza virus as a test to distinguish between naturally infected and vaccinated horses: proof of concept studies. *Aust. Vet. J.*, **89** (S1), S45–S46. doi:10.1111/j.1751-0813.2011.00743.x.
26. Roest H., Tilburg J., Van der Hoek W., Vellema P., Van Zijderveld F., Klaassen C. y Raoult D. (2011). – The Q fever epidemic in The Netherlands: history, onset, response and reflection. *Epidemiol. Infect.*, **139** (1), 1–12. doi:10.1017/S0950268810002268.
27. Sellens E., Bosward K.L., Norris J.M., Wood N., Heller J., Graves S. y Gidding H.F. (2020). – *Coxiella burnetii* seroprevalence in unvaccinated veterinary workers in Australia: Evidence to support Q fever vaccination. *Zoonoses Pub. Hlth*, **67** (1), 79–88. doi:10.1111/zph.12658.

28. Muleme M., Campbell A., Stenos J., Devlin J.M., Vincent G., Graves S., Cameron A.R., Wilks C.R. y Firestone S.M. (2017). – A longitudinal study of *Coxiella burnetii* transmission dynamics in intensively-managed kid goats supports early use of vaccines. *Vet. Res.*, **48** (1), 50. doi:10.1186/s13567-017-0452-3
29. Guthrie A.J., Maclachlan N.J., Joone C., Lourens C.W., Weyer C.T., Quan M., Monyai M.S. y Gardner I.A. (2013). – Diagnostic accuracy of a duplex real-time reverse transcription quantitative PCR assay for detection of African horse sickness virus. *J. Virol. Methods*, **189** (1), 30–35. doi:10.1016/j.jviromet.2012.12.014.
30. Sergeant E.S., Grewar J.D., Weyer C.T. y Guthrie A.J. (2016). – Quantitative risk assessment for African horse sickness in live horses exported from South Africa. *PLoS ONE*, **11** (3), e0151757. doi:10.1371/journal.pone.0151757.
31. Mayo C.E., Weyer C.T., Carpenter M.J., Reed K.J., Rodgers C.P., Guthrie A.J., Mullens B.A., Barker C.M., Reisen W.K. y MacLachlan N.J. (2021). – Diagnostic applications of molecular and serological assays for bluetongue and African horse sickness. *En La ciencia de la validación de pruebas de diagnóstico, elemento clave para la detección y el control eficaces de enfermedades animales infecciosas* (A. Colling & I.A. Gardner, coords.). *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **40** (1), XXX-YYY. doi:10.20506/rst.40.1.XXXX.
32. Tolpinrud A., Firestone S.M., Diaz-Méndez A., Wicker L., Lynch S.E., Dunowska M. y Devlin J.M. (2020). – Serological evidence for the presence of wobbly possum disease virus in Australia. *PLoS ONE*, **15** (8), e0237091. doi:10.1371/journal.pone.0237091.
33. Gardner I.A. y Greiner M. (2006). – Receiver-operating characteristic curves and likelihood ratios: improvements over traditional methods for the evaluation and application of veterinary clinical pathology tests. *Vet. Clin. Pathol.*, **35** (1), 8–17. doi:10.1111/j.1939-165x.2006.tb00082.x.
34. Caraguel C.G.B. y Colling A. (2021). – Diagnostic likelihood ratio – the next-generation of diagnostic test accuracy measurement. *En La ciencia de la validación de pruebas de diagnóstico, elemento clave para la detección y el control eficaces de enfermedades animales infecciosas* (A. Colling & I.A. Gardner, coords.). *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **40** (1), XXX-YYY. doi:10.20506/rst.40.1.XXXX.
35. Christensen J. y Gardner I.A. (2000). – Herd-level interpretation of test results for epidemiologic studies of animal diseases. *Prev. Vet. Med.*, **45** (1–2), 83–106. doi:10.1016/s0167-5877(00)00118-5.

36. Colling A., Lunt R. [...] y Daniels P. (2018). – A network approach for provisional assay recognition of a Hendra antibody ELISA – test validation with low sample numbers from infected horses. *J. Vet. Diagn. Invest.* **30** (3), 362–396. doi:10.1177/1040638718760102.
37. Ludi A.B., Mioulet V., Bakkali Kassimi L., Lefebvre D.J., De Clercq K., Chitsungo E., Nwankpa N., Vosloo W., Paton D.J. y King D.P. (2021). – Selection and use of reference panels: a case study highlighting current gaps in the materials available for foot and mouth disease. *En La ciencia de la validación de pruebas de diagnóstico, elemento clave para la detección y el control eficaces de enfermedades animales infecciosas* (A. Colling & I.A. Gardner, coords.). *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **40** (1), XX-YYY. doi:10.20506/rst.40.1.XXXX.
38. Watson J., Carlile G.A. y Williams D.T. (2021). – The value of virtual biobanks for transparency purposes with respect to reagents and samples used during test development and validation. *En La ciencia de la validación de pruebas de diagnóstico, elemento clave para la detección y el control eficaces de enfermedades animales infecciosas* (A. Colling & I.A. Gardner, coords.). *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **40** (1), XXX-YYY. doi:10.20506/rst.40.1.XXXX.
39. Muller J., Gwozdz J., Hodgeman R., Ainsworth C., Kluver P., Czarnecki J., Warner S. y Fegan M. (2015). – Diagnostic performance characteristics of a rapid field test for anthrax in cattle. *Prev. Vet. Med.*, **120** (3–4), 277–282. doi:10.1016/j.prevetmed.2015.03.016.
40. Agriculture Victoria (2020). – Significant disease investigation (SDI) program. Department of Jobs, Precincts and Regions, Victoria, Australia. Disponible en: <https://agriculture.vic.gov.au/biosecurity/animal-diseases/significant-disease-investigation-sdi-program> (fecha de consulta: 8 de octubre de 2020).
41. Center for Health Security (2020). – Serology-based tests for COVID-19. John Hopkins Bloomberg School of Public Health, Baltimore (Estados Unidos de América). Disponible en: www.centerforhealthsecurity.org/resources/COVID-19/serology/Serology-based-tests-for-COVID-19.html (fecha de consulta: 8 de octubre de 2020).
42. Stevenson M., Halpin K. y Heuer C. (2021). – Detection of emerging infectious zoonotic diseases. *En La ciencia de la validación de pruebas de diagnóstico, elemento clave para la detección y el control eficaces de enfermedades animales infecciosas* (A. Colling & I.A. Gardner, coords.). *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **40** (1), XXX-YYY. doi:10.20506/rst.40.1.XXXX.
43. Reising M.M., Tong C., Harris B., Toohey-Kurth K.L., Crossley B., Mulrooney D., Tallmadge R.L., Schumann K.R., Lock A.B. y Loiacono C.M. (2021). – A review of guidelines for evaluating a minor modification to a validated assay. *En La ciencia de la validación de pruebas*

de diagnóstico, elemento clave para la detección y el control eficaces de enfermedades animales infecciosas (A. Colling & I.A. Gardner, coords.). *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **40** (1), XXX-YYY. doi:10.20506/rst.40.1.XXXX.

OIE pre-print

Cuadro I

Ejemplos de patógenos inscritos en las listas de la OIE y pruebas empleadas con distintos fines

Propósito definido por la OIE	Ejemplo
1.a) Demostrar la ausencia de infección con y/o sin vacunación	<ul style="list-style-type: none"> • Pruebas destinadas a demostrar la “ausencia histórica”, p.ej. pruebas de vigilancia del virus de la peste porcina africana (PPA) en un país que nunca haya sufrido un brote de PPA y en el que todas las pruebas de vigilancia y cribado hayan resultado negativas. En principio el país también debe presentar un riesgo insignificante de introducción de la PPA en el curso del mismo período. • Gripe equina. Ensayo inmunoenzimático (ELISA) de bloqueo utilizado en combinación con una vacuna seleccionada específicamente (con el virus de la viruela del canario como vector) para posibilitar la discriminación entre animales infectados y animales vacunados (DIVA) y la subsiguiente demostración de ausencia de la enfermedad tras la penetración y un brote de grandes dimensiones de la enfermedad y su erradicación en 2007 (25). Este ejemplo se aplica también a 1.b).
1.b) Demostrar la ausencia de infección después de un brote	<ul style="list-style-type: none"> • Examen histopatológico del cerebro de animales con signos neurológicos para detectar la proteína prion modificada vinculada a la encefalopatía espongiforme bovina. • Desarrollo y evaluación de dos ensayos con sonda TaqMan destinados a detectar el virus del síndrome de las manchas blancas en animales aparentemente sanos para demostrar la ausencia de infección después de un brote que afectó a camarones australianos.
2) Certificar la ausencia de infección o la presencia del agente causal en productos o animales concretos con fines de comercio o transporte	<ul style="list-style-type: none"> • Pruebas serológicas para certificar el estado sanitario de gatos y perros que hacen un desplazamiento internacional, como la prueba de inmunofluorescencia indirecta de detección de Ehrlichia canis, la prueba de seroaglutinación para Brucella canis o la prueba de seroneutralización (SN) para detectar el virus Hendra en caballos.

3) Contribuir a la erradicación de una enfermedad o a la eliminación de una infección en poblaciones definidas

4) Confirmar el diagnóstico de casos clínicos o sospechosos (incluida la confirmación de resultados positivos de pruebas de cribado)

5) Estimar la prevalencia de infección o exposición para facilitar el análisis del riesgo (estudios, estado sanitario de rebaños, medidas de control de enfermedad)

- Pruebas serológicas y de análisis de mezclas de leche para detectar **Brucella abortus** en ganado bovino, prueba cutánea del pliegue caudal para detectar **Mycobacterium bovis** en especies de rumiantes sensibles, pruebas serológicas para detectar el **virus de la enfermedad de Aujeszky (pseudorabies virus)** en piaras industriales y pruebas serológicas y de detección antigénica en rebaños bovinos y mezclas de leche, por ELISA y reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcripción inversa (RT-PCR), para la eliminación de **Mycoplasma bovis** en Nueva Zelanda.
- Confirmación de la presencia de **fiebre aftosa** en un rebaño bovino en el que algunos ejemplares presenten signos clínicos, como vesículas o hipersalivación. Si se descarta la fiebre aftosa por los resultados negativos de la prueba, cabe realizar pruebas para otras enfermedades siguiendo una lista de diagnósticos diferenciales.
- Uso de una prueba de SN para el **virus Hendra** para confirmar un resultado positivo obtenido por ELISA (proteína G soluble del virus) en un caballo no vacunado.
- ELISA de detección de anticuerpos contra el grupo del **virus de la lengua azul** y ulterior serotipificación de los sueros positivos por seroneutralización.
- Hisopado positivo al virus de la **influenza aviar** (AI) con sonda TaqMan A y análisis de hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) (incluida tipificación/secuenciación del patógeno).
- Pruebas serológicas y moleculares para el **virus de la lengua azul**, incluida la secuenciación para calcular la prevalencia de infección o exposición y vigilar el espectro de virus presentes (serotipos exóticos), modificando también la distribución geográfica para facilitar el análisis del riesgo (*National Arbovirus Monitoring Program* [NAM] de Australia).
- Uso masivo del análisis por PCR de mezclas de leche durante el brote de **fiebre Q** ocurrido en los Países Bajos entre 2009 y 2010 para orientar las actividades de vigilancia y respuesta (26).
- Análisis por inmunofluorescencia indirecta de muestras de suero de bovinos cárnicos industriales de Australia para confirmar serológicamente la exposición a **Coxiella burnetii** (27).

6) Determinar el estado inmunitario de individuos o poblaciones (tras la vacunación)

- Prueba de neutralización viral por anticuerpos fluorescentes (FAVN) para evaluar el estado inmunitario de perros y gatos tras la vacunación contra el **virus de la rabia** (con fines de desplazamiento internacional [prueba FAVN > 0,5 UI para considerar al animal protegido contra la rabia y apto para viajar]).
- Uso de los títulos obtenidos con la prueba de SN en caballos vacunados contra el **virus Hendra** para evaluar la respuesta inmunitaria tras la vacunación.
- Prueba de inhibición de la hemaglutinación para el seguimiento en la bandada de los títulos de anticuerpos contra el **virus de la enfermedad de Newcastle** después de la vacunación.
- ELISA de competición frente a los anticuerpos contra la hemaglutinina del virus de la **peste de pequeños rumiantes** (PPR) para calcular la prevalencia de inmunidad tras la vacunación.
- Uso de un ensayo de inmunofluorescencia para detectar la metritis contagiosa equina (infección por **Taylorella equigenitalis**) en sementales y yeguas al inicio de la temporada reproductiva.
- Investigación epidemiológica de la dinámica de una enfermedad, p.ej. estudio longitudinal de la respuesta serológica ante **C. burnetii** y la excreción de la bacteria en cabritos de rebaños de producción intensiva para determinar el momento idóneo para la vacunación (28).

7) "Otros"
Control estacional de infecciones e investigaciones epidemiológicas

Cuadro 1

Definición de los parámetros de exactitud de una prueba

Sensibilidad de diagnóstico (DSe) =

Porcentaje de animales realmente infectados que darían resultado positivo

Especificidad de diagnóstico (DSp) =

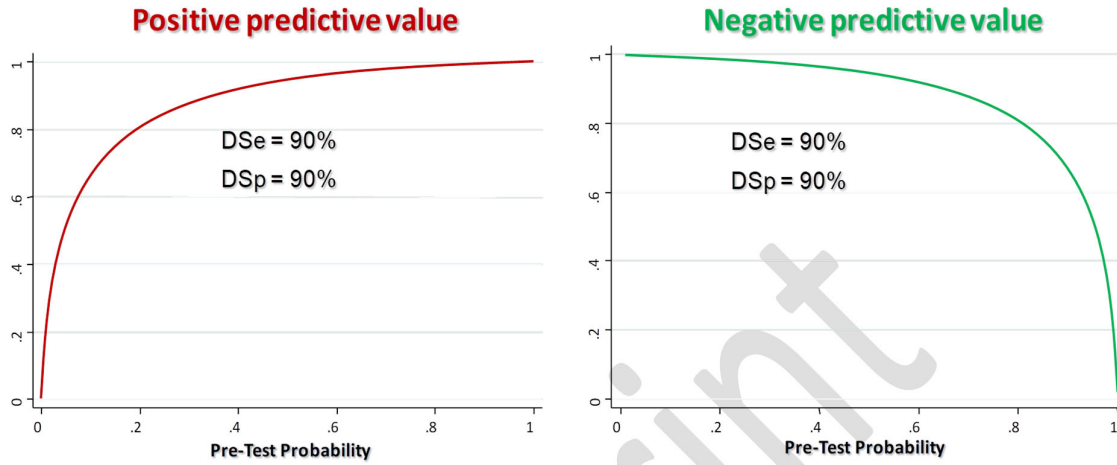
Porcentaje de animales realmente no infectados que darían resultado negativo

Razón de verosimilitudes positiva (RV+) =

Cuán mayor es la probabilidad prevista de que la prueba resulte positiva en un animal infectado en comparación con un animal no infectado: $RV+ = DSe/(1-DSp)$

Razón de verosimilitudes negativa (RV-) =

Cuán mayor es la probabilidad prevista de que la prueba resulte negativa en un animal no infectado en comparación con un animal infectado: $RV- = (1-DSe)/DSp$



Texte des figures

Valor predictivo positivo

Valor predictivo negativo

Probabilidad antes de la prueba

DSe: sensibilidad de diagnóstico

DSp: especificidad de diagnóstico

Figura 1

Valores predictivos positivo y negativo de una prueba con DSe = DSp = 90%, expresados como función de la probabilidad antes de la prueba para un solo animal (o de la prevalencia en la población de origen si no hay información sobre los factores de riesgo del animal, como edad o signos clínicos, para distinguir su nivel de riesgo del de otros animales de la misma población)