



**Organización
Panamericana
de la Salud**

Oficina Regional de la
Organización Mundial de la Salud

Salud Pública Veterinaria

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa

Instructivo de Uso

NCPanaftosa - Prueba Tamiz – Bovino

Kit diagnóstico para detección de anticuerpos contra proteínas no capsidales del Virus de la Fiebre Aftosa

Conjunto de reactivos para la detección *in vitro* de anticuerpos contra la poliproteína 3ABC del Virus de la Fiebre Aftosa suficiente para la evaluación de 890 muestras de suero bovino / búfalo (*Bubalus bubalis*)

USO VETERINARIO

ÍNDICE

1. NOMBRE Y USO RECOMENDADO	3
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. PRINCIPIO DEL ENSAYO	3
4. CUIDADOS Y PRECAUCIONES	4
5. MATERIALES SUMINISTRADOS EN EL KIT	4
6. MATERIAL Y EQUIPOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS	5
6.1. Material de laboratorio	5
6.2. Equipos	6
7. MANEJO Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS	6
8. PROCEDIMIENTO	6
8.1 Procedimientos preliminares	
TABLA I – Volúmenes a preparar en función del número de muestras	7
TABLA II – Preparación del conjugado y sustrato en función del número de placas.....	7
8.2. Ejecución del ensayo	7
9. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS	11
9.1. Criterio de aceptación de los resultados.....	11
9.2. Cálculo e interpretación de resultados	11
9.3. Control de calidad interno	11
10. CONSIDERACIONES GENERALES.....	12
10.1. Eventuales problemas y posibles causas	12
10.2. Consideraciones metodológicas.....	13
11. DESCRIPCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO DE LA PRUEBA.....	13
12. BIBLIOGRAFIA	14
13. ANEXO: Planilla de prueba.....	16

1. NOMBRE Y USO RECOMENDADO

El kit denominado NCPanaftosa – Prueba Tamiz – Bovino, está integrado por un conjunto de reactivos necesarios para realización de ensayo inmunoenzimático que permite la detección *in vitro* de anticuerpos contra la proteína no capsidal (PNC) 3ABC del Virus de la Fiebre Aftosa (VFA). Este ensayo, que consiste en una prueba I-ELISA (Indirect – Enzyme Linked Immunosorbent Assay), fue estandarizado como prueba tamiz de un sistema que usa el “NCPanaftosa – Prueba Confirmatoria – Bovino” EITB (Enzyme-Linked Immunoelctrotransfer Blot), como prueba confirmatoria. Su uso está recomendado en la vigilancia activa de la Fiebre Aftosa en poblaciones menores de 2 años. El kit también puede ser usado para uso en sueros de búfalo (*Bubalus bubalis*) en las mismas condiciones que para el suero de bovinos.

2. INTRODUCCIÓN

La Fiebre Aftosa, enfermedad infecciosa que afecta los animales biungulados, es causada por el VFA. Los animales infectados presentan en general lesiones (aftas) en la boca y patas, pudiendo ocurrir el establecimiento de infección subclínica, incluso estando vacunados, que se puede hacer persistente, y de duración variable, que en el bovino puede extenderse a más de dos años. Debido a esta característica, la demostración fehaciente de ausencia de actividad viral es esencial para acompañar la evolución de los programas de erradicación.

El presente ensayo, desarrollado para evaluar actividad viral en poblaciones animales, introdujo un enfoque diagnóstico innovador, basado en la detección de anticuerpos contra la proteína no capsidal 3ABC del VFA, como marcador de exposición al virus activo. Puede ser usado independientemente del estado de vacunación del animal. Como las PNC son altamente conservadas entre los diferentes serotipos, la prueba puede ser aplicada para investigación de cualquier serotipo del VFA.

3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

El ensayo se realiza en 3 etapas: 1. Incubación de muestras (suero bovino y/o bubalino); 2. Incubación del conjugado y 3. Incubación del sustrato. Siguen a las dos primeras etapas ciclos de lavado y a la última la adición de solución bloqueadora para detener la reacción.

Incubación de las muestras: la proteína 3ABC, inmovilizada en la microplaca, al entrar en contacto con la muestra, reaccionará con los anticuerpos específicos (de estar presentes) formando el complejo inmune antígeno-anticuerpo. Otros anticuerpos presentes en la muestra (no específicos), no reaccionarán y serán eliminados en la etapa de lavado que sigue a la incubación, quedando solo los anticuerpos anti-3ABC adheridos a la placa a través de la proteína 3ABC.

Incubación del conjugado: en esta etapa se agrega el conjugado (anticuerpos anti-IgG de bovino con peroxidasa), que se unirá específicamente al anticuerpo bovino en el complejo antígeno-anticuerpo (de haberse formado). De no formarse el complejo en la etapa anterior, el conjugado no se unirá y será eliminado durante el lavado que sigue a este paso.

Incubación del sustrato: en esta tercera etapa se adiciona el sustrato incoloro TMB /H₂O₂ sobre el cual actúa la enzima peroxidasa del conjugado. Como resultado de la acción de la misma se observará el surgimiento de color azul en aquellos pocillos en que el antígeno haya retenido anticuerpos anti-3ABC y consecuentemente conjugado. Por último, la reacción es interrumpida al agregarse ácido sulfúrico, que provoca el viraje del color azul al amarillo.

Después de la adición del ácido se debe hacer la lectura en el lector de microplacas para medir la absorbancia para cada pocillo. La evaluación de las muestras problema se realiza a través de los resultados de los sueros controles.

4. CUIDADOS Y PRECAUCIONES

- Todos Los componentes del kit, excepto las placas auxiliares, deben conservarse en heladera (2°C a 8°C).
- Conservar los reactivos en sus envases originales.
- Respetar el plazo de validez que figura en las etiquetas de la caja.
- No usar ni mezclar componentes de otros kits, lotes o fabricantes.
- Seguir estrictamente el procedimiento recomendado para la ejecución del ensayo.
- Todos los materiales del kit se destinan a reacciones *in vitro* y deben ser manipulados cumpliendo buenas prácticas de laboratorio (BPL).
- No usar soluciones que presenten señales de alteración tales como precipitados, turbidez, etc. De observarse, las alteraciones descriptas, entrar en contacto con PANAFTOSA.
- Manipular las muestras y los sueros controles cumpliendo BPL.
- El sustrato deberá ser manoseado con cuidado, ya que contiene dimetilsulfóxido (DMSO) que es fácilmente absorbido por la piel.
- Evitar el contacto con la solución bloqueadora. De ocurrir, lavar el área afectada con abundante cantidad de agua.
- Todos los materiales y residuos de la prueba (placas, frascos y líquidos resultantes de las diferentes etapas) deberán ser tratados antes de ser eliminados. Se recomienda autoclavar durante 45 minutos a 121 °C a 1 atmósfera de presión o tratar con hipoclorito de sodio a concentración final de 5% durante 1 hora.

5. MATERIALES SUMINISTRADOS EN EL KIT

Composición

- 5.1 Microplacas sensibilizadas con la proteína 3ABC **MP** 10 microplacas
Microplacas con 96 pocillos sensibilizadas con la proteína recombinante 3ABC del VFA purificada. Listas para su uso. Conservar en heladera (2°C a 8°C).
- 5.2 Solución PBS – Tween 20x concentrada **PB** 2 frascos conteniendo 160 ml cada uno
Solución PBS – Tween 20, concentrada 20 veces, con conservante, para la preparación de la solución de lavado, y del diluyente de muestra/conjugado, según lo indicado en los "Procedimientos preliminares". Conservar en heladera (2°C a 8°C).
- 5.3 *Escherichia coli* **EC** 1 tubo conteniendo 450 µl
Lisado de *Escherichia coli* para adicionar al diluyente de muestra/conjugado según lo indicado en los "Procedimientos preliminares". Conservar en heladera (2°C a 8°C).
- 5.4 Leche en polvo descremada **LP** 1 bolsa plástica conteniendo 25 g
Leche en polvo descremada, para adicionar al diluyente de muestra/conjugado según lo indicado en los

"Procedimientos preliminares". Una vez abierta la bolsa, mantener el resto del contenido herméticamente cerrado en heladera (2°C a 8°C).

- 5.5 Suero equino **SE** 1 frasco conteniendo 45 ml
Suero equino irradiado con conservantes, para agregar al diluyente de muestra/conjugado según lo indicado en los "Procedimientos preliminares". Conservar en heladera (2°C a 8°C).
- 5.6 Suero Control Negativo **CN** 1 tubo conteniendo 300 µl
Suero bovino sin anticuerpos contra el VFA, tratado con cloroformo y BEI, con conservante. Manipular según lo indicado en "Incubación de las muestras". Conservar en heladera (2°C a 8°C). Centrifugar antes del uso para aprovechar el volumen total.
- 5.7 Suero Control Padrón 1 **CP1** 1 tubo conteniendo 350 µl
Suero bovino con anticuerpos contra la proteína 3ABC del VFA, tratado con cloroformo y BEI, con conservante. Manipular según lo indicado en "Incubación de muestras". Conservar en heladera (2°C a 8°C). Centrifugar antes del uso para aprovechar el volumen total.
- 5.8 Suero Control Padrón 2 **CP2** 1 tubo conteniendo 300 µl
Suero bovino con anticuerpos contra la proteína 3ABC del VFA, tratado con cloroformo y BEI, con conservante. Manipular según lo indicado en "Incubación de muestras". Conservar en heladera (2°C a 8°C). Centrifugar antes del uso para aprovechar el volumen total.
- 5.9 Conjugado 100x concentrado **CJ** 1 tubo conteniendo 1,2 ml
Anticuerpos de conejo anti-IgG bovino conjugados con peroxidasa, con estabilizante. Diluir según lo indicado en la Tabla II. Conservar en heladera (2°C a 8°C).
- 5.10 Diluyente de sustrato **DS** 1 frasco conteniendo 120 ml
Solución de ácido cítrico en buffer fosfato con peróxido de hidrógeno, específica para la dilución del sustrato. Conservar en heladera (2°C a 8°C). Lista para su uso.
- 5.11 Sustrato 100x concentrado **ST** 1 tubo conteniendo 1,2 ml
Solución de tetrametilbencidina (TMB) en dimetilsulfóxido (DMSO), 100x concentrada. Diluir según indicado en la Tabla II. Conservar en heladera (2°C a 8°C).
- 5.12 Solución bloqueadora **SB** 1 frasco conteniendo 120 ml
Solución de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1N. Lista para su uso. Conservar en heladera (2°C a 8°C).
- 5.13 Placas auxiliares **PA** 10 unidades
Microplacas con 96 pocillos para dilución previa de controles y sueros, listas para su uso. Conservar a temperatura ambiente en embalaje de plástico. Uso único.

6. MATERIAL Y EQUIPOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

6.1. Material de laboratorio

- Pipeta multicanal de volumen ajustable (200 µl) y micropipetas monocanal de volumen ajustable (10 ó 20, 100 y 1000 µl), con precisión y exactitud verificada. Punteras descartables adecuadas para las micropipetas; garantizar que las mismas no retengan inmunoglobulinas, lo que puede interferir con los resultados de la prueba.
- Papel secante.

- Material de laboratorio para preparar las soluciones.
- Agua deionizada y/o destilada.
- Hipoclorito de sodio para tratar el material a descartar (materiales y soluciones resultantes de la prueba).

6.2. Equipos

- Lavadora de placas manual o automática.
- Estufa 37°C.
- Lector de microplacas con filtros para lectura a 450 y 620 nm.
- Homogeneizador tipo vortex.
- Balanza.
- Microcentrífuga tipo Eppendorf o similar.

Seguir las instrucciones de los fabricantes para el uso, frecuencia de calibración y mantenimiento de los equipos.

7. MANEJO Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Para el manejo y conservación de los sueros recomendamos:

- Conservarlos en heladera (2°C a 8°C) no más que 7 días; para períodos mayores, conservarlos a $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$.
- Evitar repetidos ciclos de congelado / descongelado.
- No usar sueros contaminados o que presenten precipitados.
- Homogeneizar los sueros antes de usarlos.

8. PROCEDIMIENTO

8.1. Procedimientos preliminares

- Aproximadamente una hora antes de comenzar la prueba retirar los siguientes reactivos de la heladera (microplacas MP 3ABC, PBS 20x, Diluyente de Sustrato y Solución Bloqueadora) para permitir que se establezcan a temperatura ambiente (TA) $22^{\circ}\text{C} - 25^{\circ}\text{C}$. Preparar el diluyente de muestra/conjugado y la solución de lavado 1x, dejándolos estabilizar también a TA. Después del uso, devolver el suero equino, *E.coli* y la leche a la heladera. El sustrato 100x debe estar líquido y homogéneo en el momento de usarlo. Retirarlo del refrigerador 40-60 minutos antes del uso dejándolo estabilizar a TA. Retirar los otros reactivos (sueros padrones, sueros problema, conjugado 100x y sustrato 100x) en el momento de usarlos. Preparar la planilla de la prueba (Ver Anexo), teniendo en cuenta que deben ser reservados, como mínimo, 2 pocillos para el suero Control Negativo (CN), 3 pocillos para el suero Control Padrón 1 (CP1), 2 pocillos para el suero Control Padrón 2 (CP2).
- Homogeneizar los reactivos antes de su uso.
- Preparar las soluciones necesarias para la prueba en función del número de muestras (placas) a procesar siguiendo lo especificado en la Tabla I:

TABLA I – Volúmenes a preparar en función del número de muestras

Número de muestras	Buffer de lavado	Diluyente de muestra / conjugado
1 placa = Hasta 89 muestras	500 ml	30 ml
2 placas = Hasta 178 muestras	1000 ml	60 ml
3 placas = Hasta 267 muestras	1500 ml	90 ml
4 placas = Hasta 356 muestras	2000 ml	120 ml
5 placas = Hasta 445 muestras	2500 ml	150 ml

- Buffer de lavado: Diluir 20 veces con agua deionizada y/o destilada la solución PBS – Tween 20x (PB). De observarse precipitados en la solución PB, disolverlos entibiando la solución en Baño María a 37° C previo a la dilución.
- Diluyente de muestras/conjugado: Para preparar 100 ml de esta solución disolver 5 g de leche en polvo descremada (LP) en aproximadamente 50 ml de buffer de lavado (preparado anteriormente). Agregar 10 ml de suero equino (SE) y 100 µl de Escherichia coli (EC), homogeneizar y llevar a volumen final con buffer de lavado (preparado anteriormente). Preparar en el momento de uso el volumen suficiente para cada prueba, descartando el volumen no utilizado al final de la prueba.
- La dilución del conjugado y del sustrato debe realizarse entre 5 a 10 minutos antes de su uso, de acuerdo a lo especificado en la Tabla II.

TABLA II – Preparación del conjugado y sustrato en función del número de placas

Número de placas	Diluyente de muestra / conjugado	Conjugado 100x	Diluyente de sustrato	Sustrato 100x
1	11 ml	110 µl	11 ml	110 µl
2	22 ml	220 µl	22 ml	220 µl
3	32 ml	320 µl	32 ml	320 µl
4	42 ml	420 µl	42 ml	420 µl
5	52 ml	520 µl	52 ml	520 µl

8.2. Ejecución del ensayo

Incubación de las muestras

- Pre diluir las muestras problema en las placas auxiliares suministradas en el kit. Para ello, colocar 190 µl de diluyente de muestra/conjugado en todos los pocillos de la placa auxiliar (**PA**). Agregar 10 µl de cada muestra problema en los pocillos asignados para las mismas. Usar una puntera nueva

para cada muestra. Homogeneizar las diluciones. Se debe proceder de la misma manera con los sueros controles. Transferir con pipeta multicanal 100 µl de los sueros pre-diluidos a la placa sensibilizada, respetando las posiciones de los mismos.

- Opcional: Colocar 95 µl de diluyente de muestra/conjugado en los pocillos a ser usados de la microplaca MP 3ABC. Agregar 5 µl de muestra o suero control (dilución final 1:20) en el pocillo asignado, siguiendo el orden establecido en la planilla de la prueba. Se recomienda que la tercera y/o cuarta replica del CP1 sea aplicada después de la inoculación de todas las muestras. Utilizar una puntera nueva para cada suero. No deben transcurrir más de 10 minutos entre la dilución del primero y el último suero, a fin de garantizar la correcta interpretación de los resultados.

Sellar la placa e incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos.

Antes de finalizar la etapa de incubación de las muestras preparar el conjugado diluido según las indicaciones de la Tabla II.

Lavado

Después de concluida la etapa de incubación de las muestras vaciar la placa evitando que transborde líquido de un pocillo a otro. Lavar la placa un total de 6 veces en tres ciclos dobles, o sea lavar cada hilera dos veces antes de pasar a la hilera siguiente. Evitar, en el lavado, que tanto el líquido transborde de los pocillos (usar un volumen de aproximadamente 0,3 ml para cada lavado, como también que las agujas de la lavadora toquen la placa. La cuidadosa ejecución de esta etapa es fundamental para obtenerse un buen resultado. Si no se dispone de lavadora automática, el lavado podrá ser realizado manualmente. Concluido el ciclo de lavado, eliminar los restos de solución de lavado golpeando la placa invertida sobre papel secante.

Incubación del conjugado

- Agregar 100 µl de conjugado diluido por pocillo. Sellar la placa e incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos \pm 30 segundos.

- Antes del final de la etapa de incubación del conjugado preparar el sustrato-cromógeno, según lo indicado en la Tabla II. Caso la temperatura ambiente esté por debajo de 22°C, se recomienda estabilizar el volumen necesario de diluyente de sustrato necesario para la prueba por 10 minutos a 37°C. Una vez estabilizado, preparar el sustrato-cromógeno y usar inmediatamente.
- Antes de usar el sustrato concentrado verificar que esté líquido y homogéneo (punto de fusión 18°C). La solución final de sustrato diluido preparada debe ser incolora o de un color amarillo muy pálido. De observarse color más intenso descartar la solución y preparar nova.

Lavado

- Proceder según indicado para la etapa anterior de lavado.

Incubación del sustrato-cromógeno

- Agregar 100 ul de sustrato-cromógeno a cada pocillo e incubar a TA (22 °C a 25 °C) por 15 minutos \pm 15 segundos.
- Agregar 100 ul de solución bloqueadora a cada pocillo.

Lectura de la placa

- La lectura de la placa debe ser realizada en un plazo máximo de 30 minutos después de la adición de la solución bloqueadora. Realizar lectura con doble filtro: 450 nm y 620 nm para corrección automática de blanco.

Resumen de los procedimientos del ensayo

Etapa	Volumen	Procedimiento
<u>Pre dilución de muestras</u>		
Dil. muestra/conjugado	190 µl	Adicione en todas las cavidades de la placa auxiliar.
Controles y muestras	10 µl	Adicione en las cavidades asignadas y homogenice suavemente.
	100 µl	Transfiera de la placa auxiliar para la placa sensibilizada.
<u>Dilución directa (opcional)</u>		
Dil. muestra/conjugado	95 µl	Adicione en todas las cavidades de la placa 3ABC.
Controles y muestras	5 µl	Adicione en las cavidades asignadas y homogenice suavemente.
<u>Incubación de las muestras</u>		Cubra la placa. Incube durante 30 minutos ± 30 segundos a 37°C . 2 minutos antes del inicio del lavado prepare el conjugado diluido.
<u>Lavado</u>	6 x ~0,3 ml	Lave en 3 ciclos dobles (total 6 veces).
<u>Incubación del conjugado</u>		
Conjugado diluido	100 µl	Adicione a cada cavidad. Cubra a placa. Incube durante 30 minutos ± 30 segundos a 37°C. 2 minutos antes del inicio del lavado prepare el sustrato diluido.
<u>Lavado</u>	6 x ~0,3 ml	Lave en 3 ciclos dobles (Total 6 veces).
<u>Incubación del sustrato</u>		
Sustrato diluido	100 µl	Adicione a cada cavidad. Incube durante 15 minutos ± 30 segundos a 22°C – 25°C (TA).
<u>Bloqueo de la reacción</u>		
Solución bloqueadora	100 µl	Adicione a cada cavidad.
<u>Lectura de la placa</u>		Lea la absorbancia a 450/620 nm en un plazo máximo de 30 minutos.

9. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

9.1. Criterio de aceptación de los resultados

La prueba será válida solamente si los sueros controles cumplen los siguientes requisitos.

- Suero Control negativo (**CN**) – el valor de absorbancia de cada una de las réplicas debe ser inferior a 0,1. Si se trabaja con tres réplicas y una de ellas resulta superior a 0,1, la misma podrá ser desconsiderada para cálculo de la media. Calcular la media con por lo menos dos valores validos.
- Suero Control Padrón 1 (**CP1**) - El valor de absorbancia de cada una de las réplicas, luego de sustraer el valor de absorbancia de la media del control negativo (**CN**), debe ser superior a 0,15. Si después de descontar el valor de absorbancia de la media del control negativo (**CN**), una de las tres réplicas del **CP1** resulta inferior a 0,15 desconsiderar el valor y calcular la media con por lo menos dos valores válidos.
- Suero Control Padrón 2 (**CP2**) – Sustraer del valor de absorbancia de cada réplica el valor de la media del **CN**. Calcular la media.
- La relación **CP2/CP1** deberá ser igual a 2,1, con variación máxima de $\pm 25\%$ (1,6 a 2,6)

9.2. Cálculo e interpretación de resultados

Expresar los resultados en relación al Suero Control Padrón 1 (**CP1**) como:

$$T/C = (\text{Absorbancia del suero en análisis} - \text{media Absorbancia CN}) / (\text{media CP1}^*)$$

* Calculada como referido en el punto 9.1

La muestra deberá ser considerada:

- no reactiva para valores de $T/C < 0,8$.
- inconclusa o sospechosa para valores de $0,8 \leq T/C < 1$.
- reactiva para valores de $T/C \geq 1$.

Nota: Caso la prueba sea utilizada para análisis comparativo de muestras colectadas de un mismo animal recomendamos que el procesamiento de las mismas sea realizado en una única placa.

9.3. Control de calidad interno

Con el propósito de evaluar la ejecución de la prueba en su laboratorio, a lo largo del tiempo en las condiciones locales, se recomienda entre otras cosas:

- a) Uso regular de material de referencia certificado y/o control de calidad interno utilizando materiales de referencia secundarios.
- b) Participación en comparaciones interlaboratoriales.
- c) La confección de curvas de control de proceso con los valores de absorbancia de las réplicas (duplicados/triplicados/etc.) de los sueros controles (CN, CP1 y CP2), así como las medias calculadas para los mismos, obtenidas diariamente, según las especificaciones del ítem 9.1. Se recomienda enviar a PANAFTOSA los resultados de absorbancia de los sueros controles de todas las pruebas procesadas para acompañamiento y retroalimentación.

En el Certificado de Análisis, anexado a cada lote, se presentan las especificaciones con las cuales PANAFTOSA trabaja los controles. Es importante remarcar que PANAFTOSA trabaja con pre-dilución de muestras en la placa auxiliar, lo que permite la aplicación de las mismas en la placa MP 3ABC en un periodo de tiempo no significativo cuando comparado a la duración de la etapa de incubación de muestras. Considerar dichos valores de especificación solamente para orientación.

10. CONSIDERACIONES GENERALES

10.1. Eventuales problemas y posibles causas

- ausencia total de reacción o coloración tenue – verifique la calidad del agua; mantenga el excedente de conjugado y sustrato diluido hasta el final de la prueba para confirmar que ocurre el desarrollo de color mezclando las soluciones. Controlar posibles retenciones en punteras.
- sueros controles fuera del rango – verifique la temperatura de la sala y estufa; controle que los tiempos de incubación sean los recomendados, confiera el estado de calibración de las micropipetas; verifique la calidad del lavado del material o la calidad del material descartable.
- resultados no reproducibles - verifique el estado de calibración de las micropipetas; asegúrese que los procedimientos de lavado sean los recomendados. Controle que no haya contaminación química o microbiológica de los tubos y válvulas utilizados en el sistema de lavado. Compruebe el estado de calibración de lector de microplacas. Verifique la calidad de lavado del material o la calidad del material descartable.

10.2. Consideraciones metodológicas

Como la prueba está basada en la detección de anticuerpos, debe tenerse en consideración que la presencia de los mismos no indica necesariamente la presencia del virus, ya que pueden estar reflejando no solo infección presente, sino también una infección pasada. Asimismo, es importante resaltar que existe un intervalo temporal entre la exposición al virus y la formación de anticuerpos. Ensayos realizados con NCPanaftosa Prueba Tamiz – Bovino en animales experimentalmente infectados permitieron establecer que el proceso de seroconversión puede detectarse a partir de los 7 días post infección.

11. DESCRIPCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO DE LA PRUEBA

- La especificidad, estimada con sueros de animales de áreas libres sin vacunación de América del Sur y Europa resultó en valores que excedieron el 98%.
- La sensibilidad calculada para animales con infección persistente comprobada, establecida de forma experimental, y en animales de campo no vacunados, de América del Sur y Europa llega al 100%. Para animales vacunados y con infección persistente comprobada la sensibilidad se aproxima al 100%. Sin embargo, cuando se evaluaron animales con infección persistente no comprobada, y probablemente sin riesgo de transmisión del virus (los animales con resultados positivos para PCR o aislamiento viral sólo en raras ocasiones y en períodos próximos a la exposición) los valores disminuyen (aproximadamente 97,2%).
- En animales vacunados de áreas libres con vacunación sistemática, los valores de especificidad diagnóstica pueden variar según la pureza de las vacunas en relación a su contenido de PNCs, así como al número de vacunaciones. En este sentido se recomienda el uso de vacunas que no induzcan respuesta de anticuerpos anti-PNC en animales vacunados / revacunados. En general, vacunas purificadas mediante métodos convencionales no inducen respuesta de anticuerpos que pueda interferir con la evaluación de los muestreos sero epidemiológicos, aunque puede observarse el desplazamiento de los valores negativos aproximándose hacia el valor de corte, con valores de especificidad cercanos al 97% en animales < 2 años.
- Se recomienda el uso de prueba confirmatoria (NCPanaftosa Prueba Confirmatoria – Bovino) para trabajar con valores de especificidad mayores, de forma tal de no comprometer el valor predictivo positivo en áreas de baja prevalencia.
- Cabe mencionar los resultados obtenidos para modelos experimentales de bovinos de PANAFOTSA, que permitieron el estudio pareado de líquido esofágico-faríngeo (LEF) y sueros. Estas muestras fueran colectadas de 85 bovinos (37 no vacunados y 48 vacunados), infectados o expuestos al VFA bajo

condiciones controladas. La colecta de las muestras se realizó durante el estado comprobado de infección (es decir, previo a la última recuperación viral positiva a partir del LEF). Independientemente del estado de vacunación, los resultados sugieren que la sensibilidad diagnóstica del sistema NCPanaftosa (Pruebas Inicial/Confirmatoria) relativa a muestras LEF positivas (n = 436) es de 100%, (muestras positivas para LEF eran aquellas en las que fue posible aislar virus). En cambio, la sensibilidad de aislamiento por LEF relativa a resultados positivos mediante el sistema NCPanaftosa (Pruebas Tamiz/Confirmatoria) (n = 893) para estos animales solo alcanzó valores de 48,8%.

- Un mejor aprovechamiento de los resultados puede ser obtenido mediante la construcción de gráficos de distribución de frecuencia de reactividades de anticuerpos resultando en perfiles que reflejan poblaciones con distinta situación epidemiológica.
- En las referencias bibliográficas se ejemplifican perfiles obtenidos para poblaciones representativas de las siguientes situaciones epidemiológicas:
 - poblaciones de animales de áreas libres sin vacunación, animales experimentalmente infectados,
 - poblaciones de animales involucrados en brotes de fiebre aftosa,
 - poblaciones de animales menores de 2 años de áreas con vacunación sistemática sin enfermedad clínica en los últimos 4 años,
 - poblaciones de animales mayores de 2 años de áreas con vacunación sistemática sin enfermedad clínica en los últimos 4 años.

12. BIBLIOGRAFIA

1. Bergmann I.E., Augé de Mello P., Neitzert E., Beck E & Gomes I. (1993) Diagnosis of persistent aphthovirus infection and its differentiation from vaccination response in cattle by use of enzyme-linked immunoelectrotransfer blot analysis with bioengineered nonstructural viral antigens. Am. J. Vet. Res., 54: 825-831.
2. Bergmann I.E. (1994) Uso de la prueba de EITB para identificaciones de áreas con ausencia de actividad viral. Veterinaria, 70: 16 - 20.
3. Bergmann I.E. & Malirat V. (1995) Performance of a rapid enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay for detection of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus. Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa, 61: 1 - 5.
4. Bergmann I.E., Malirat V., Dias L.E. & Dilandro R. (1996) Identification of foot-and-mouth disease virus-free regions by use of a standardized enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay. Am. J. Vet. Res., Vol. 57, No. 7: 972-974.
5. Bergmann I.E., Astudillo V., Malirat V. & Neitzert E. (1998) Serodiagnostic strategy for estimation of foot-and-mouth disease viral activity through highly sensitive immunoassays using bioengineered nonstructural proteins. The Veterinary Quarterly, Vol. 20, Sup. 2: S6-S9.

6. Bergmann I.E., Malirat V., Neitzert E., Panizzutti N., Sánchez C. & Falczuk (2000) Improvement of serodiagnostic strategy for FMDV surveillance in cattle under systematic vaccination: A combined system of an indirect ELISA-3ABC with an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay. Archives of Virology, Vol. 145 : 473-489
7. Bergmann I. & Neitzert E. (2000) Fiebre Aftosa. Instrumentos seroepidemiológicos para evaluar actividad viral. I-ELISA 3ABC y EITB - Sistema para detección de anticuerpos contra antígenos no estructurales del Virus de la Fiebre Aftosa. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, Manual técnico, Rio de Janeiro.
8. Bergmann I.E., Malirat V., Neitzert E. & Correa Melo E. (2003) Validation of the I-ELISA 3ABC / EITB System for Use in Foot-and Mouth Disease Surveillance: Overview of the Southamerican Experience. Foot-and-Mouth Disease: Control Strategies, 361-370. Elsevier SAS Eds.
9. Bergmann I.E., Malirat V., Neitzert E. & Correa Melo E. (2003) Vaccines and Companion Diagnostic Tests for Foot-and-Mouth Disease Virus. An overview of the Experience in South America. Vaccines for OIE List A and Emerging Animal Diseases. Dev Biol. Basel, Karger. 114: 57-63. Brown F. Roth eds.
10. Bergmann I.E., Neitzert N., Malirat V., Ortiz S., Colling A., Sánchez C. & Correa Melo E. (2003) Rapid Serological Profiling by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and its Use as an Epidemiological Indicator of Foot-and-Mouth Disease Viral Activity. Archives of Virology, Vol. 148: 891-901.
11. Bergmann I.E., Malirat V. & Neitzert E. (2003) Instrumentos Diagnósticos para la Vigilancia de la Fiebre Aftosa. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa OPS/OMS. Selección de Trabajos del Seminario Internacional sobre Uso de Instrumentos Seroepidemiológicos y Viroológicos en la Vigilancia de Fiebre Aftosa, Santiago, Chile, 10-11 de Marzo. En prensa.
12. Bergmann I.E., Malirat V. & Neitzert E. (2003) Pruebas Serológicas y Viroológicas en la Vigilancia Activa de la Fiebre Aftosa. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa OPS/OMS. Selección de Trabajos del Seminario Internacional sobre Uso de Instrumentos Seroepidemiológicos y Viroológicos en la Vigilancia de Fiebre Aftosa, Santiago, Chile, 10-11 de Marzo. En prensa.
13. Malirat V., Neitzert E., Bergmann I.E., Maradei E. & Beck E. (1998) Detection of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus by means of an indirect ELISA test using bioengineered nonstructural polyprotein 3ABC. The Veterinary Quarterly, Vol. 20, Sup. 2: S24-S26.
14. Neitzert E., Beck E., Augé de Mello P., Gomes I. & Bergmann I.E. (1991) Expression of the aphtovirus RNA polymerase gene in Escherichia coli and its use together with other bioengineered nonstructural antigens in detection of late persistent infections. Virology, 184: 799-804.
15. World Organisation for Animal Health. (OIE). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 2.1.5. (2008), Paris.
16. Charting Methods for internal Quality Control in Methods in Molecular Biology - The ELISA Guidebook. Crowther, J.R., Human Press Inc. (2001): 347-394.



Planilla de Prueba NCPanaftosa Prueba Tamiz-Bovino

Fecha: _____ Lote: _____

PBS Tween 20X: _____ Conjugado: _____

Dil.muestra/conjugado: _____ Substrato: _____

Incubación de las muestras: Hora inicio: _____ Hora fin: _____

Incubación del conjugado: Hora inicio: _____ Hora fin: _____

Incubación del sustrato: Hora inicio: _____ Hora fin: _____

Lectura da placa: Hora: _____

Sueros

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CN											
B	CN											
C	CP1											
D	CP1											
E	CP1											
F	CP2											
G	CP2											
H												

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CN											
B	CN											
C	CP1											
D	CP1											
E	CP1											
F	CP2											
G	CP2											
H												