Organização Pan-Americana da Saúde
Escritório Regional para as Américas da Organização Mundial da Saúde
Saúde Pública Veterinária
Centro Pan-Americano de Febre Aftosa

Instrutivo de Uso

NCPanaftosa - Prova Triagem – Bovino

Kit diagnóstico para detecção de anticorpos contra proteínas não capsidais do Vírus da Febre Aftosa

Conjunto de reagentes para a detecção *in vitro* de anticorpos contra a poliproteína 3ABC do Vírus da Febre Aftosa para a avaliação de 890 amostras de soro bovino / bubalino (Bubalus bubalis)

USO VETERINÁRIO

ÍNDICE

1. NOME E USO RECOMENDADO 3

2. INTRODUÇÃO 3

3. PRINCÍPIO DO ENSAIO 3

4. CUIDADOS E PRECAUÇÕES 4

5. MATERIAIS FORNECIDOS NO KIT 4

6. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS NÃO FORNECIDOS 6
   6.1. Material de laboratório 6
   6.2. Equipamentos 6

7. MANIPULAÇÃO E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS 6

8. PROCEDIMENTO 7
   8.1. Procedimentos preliminares 7
      TABELA I – Volumes de soluções a preparar em função do número de amostras 7
      TABELA II – Preparação do conjugado e substrato em função do número de placas 8
   8.2. Execução do ensaio 8

9. CÁLCULO DOS RESULTADOS 11
   9.1. Critério de aceitação dos resultados 11
   9.2. Cálculo e interpretação de resultados 11
   9.3. Controle de qualidade interno 11

10. CONSIDERAÇÕES GERAIS 12
   10.1. Eventuais problemas e possíveis causas 12
   10.2. Considerações metodológicas 12

11. DESCRIÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO DA PROVA 13

12. BIBLIOGRAFIA 14

13. ANEXO: PLANILHA DA PROVA. 16

1. NOME E USO RECOMENDADO

O kit denominado "NCPanaftosa – Prova de triagem – Bovino" é composto pelo conjunto de reagentes necessários para a realização do ensaio imunoenzimático que permite a detecção *in vitro* de anticorpos contra a proteína não capsidal (PNC) 3ABC do Vírus da Febre Aftosa (VFA). Este ensaio, que consiste em uma prova I-ELISA (Indirect – Enzyme Linked Immunosorbent Assay), foi padronizado como prova de triagem de um sistema que utiliza o "NCPanaftosa – Prova Confirmatória – Bovino" EITB (Enzyme-Linked Immunoelectrotransfer Blot), como prova confirmatória. Seu uso é recomendado na vigilância ativa da Febre Aftosa em populações menores de 2 anos. O kit também pode ser usado com soro de búfalo (*Bubalus bubalis*) nas mesmas condições que para os soros bovinos.

2. INTRODUÇÃO

A Febre Aftosa, doença infecciosa que afeta os animais biungulados, é causada pelo VFA. Os animais infectados apresentam em geral lesões (aftas) na boca e patas, podendo ocorrer infecção sub-clínica, inclusive tendo sido vacinados, que pode se tornar persistente e de duração variável, no caso do bovino pode se estender por mais do que dois anos. Devido a esta característica, a demonstração inequívoca de ausência de atividade viral é essencial para acompanhar a evolução dos programas de erradicação.

O presente ensaio, desenvolvido para avaliar atividade viral em populações animais, permitiu introduzir uma abordagem diagnóstica inovadora, baseada na detecção de anticorpos contra a proteína não capsidal 3ABC do VFA, como marcador de exposição ao vírus ativo. Pode ser usado independentemente do estado de vacinação do animal. Como as PNC são altamente conservadas entre os diferentes sorotipos, a prova pode ser aplicada para a pesquisa de qualquer sorotipo do VFA.

3. PRINCÍPIO DO ENSAIO

O ensaio se realiza em 3 etapas: 1. Incubação das amostras (soros de bovino e/ou bubalino); 2. Incubação do conjugado e 3. Incubação do substrato. Seguem às duas primeiras etapas ciclos de lavagens e à última a adição da solução bloqueadora para deter a reação.

Incubação das amostras: a proteína 3ABC, imobilizada na microplaca, ao entrar em contato com a amostra, reagirá com os anticorpos específicos (caso presentes) formando o complexo imune antígeno-anticorpo. Outros anticorpos presentes na amostra (não específicos), não reagirão e serão eliminados na etapa de lavagem que segue à incubação, permanecendo apenas os anticorpos anti-3ABC aderidos à placa através da proteína 3ABC.

Incubação do conjugado: nesta etapa é adicionado o conjugado (anticorpos anti-IgG de bovino com peroxidasa), que se unirá especificamente ao anticorpo bovino no complexo antígeno-anticorpo (no caso do mesmo ter se formado). No caso de não ter se formado o complexo na etapa anterior, o conjugado não se ligará e será eliminado na lavagem que segue a esta etapa.

Incubação do substrato: nesta terceira etapa se adiciona o substrato incolor TMB /H_2O_2 sobre o qual age a enzima peroxidase do conjugado. Como resultado da ação da mesma se observará o desenvolvimento de coloração azul nas cavidades em que o antígeno tenha retido anticorpos anti-3ABC e consequentemente conjugado. Por último, a reação é interrompida mediante a adição de ácido sulfúrico, que provoca a viragem da coloração azul para amarela.

Após a adição do ácido deve ser realizada a leitura em leitora de microplacas para medir a absorbância para cada uma das cavidades. A avaliação das amostras problema é realizada através dos resultados dos soros controle.

4. CUIDADOS E PRECAUÇÕES

- Todos os componentes do kit, a exceção das placas auxiliares, devem ser conservados em geladeira (2°C a 8°C). Recomendamos não usar equipamentos do tipo "frost-free" para armazenar os reagentes por periodos superiores a 2 semanas.
- Conservar os reagentes em seus recipientes originais.
- Respeitar o prazo de validade que consta nas etiquetas da caixa.
- Não usar nem misturar componentes de outros kits, lotes ou fabricantes.
- Seguir estritamente o procedimento recomendado para a execução do ensaio.
- Todos os materiais do kit se destinam a reações *in vitro* e devem ser manipulados de acordo às boas práticas de laboratório (BPL).
- Não usar soluções que apresentem sinais de alteração tais como precipitados, turbidez, etc. Caso se observe as alterações antes citadas, entre em contato com PANAFTOSA.
- Manipular as amostras e os soros controle de acordo às BPL.
- O substrato deverá ser manipulado com cuidado, já que contem dimetilsulfóxido (DMSO) que é facilmente absorvido pela pele.
- Evitar contato com a solução bloqueadora. Caso aconteça, lave a área atingida abundantemente com água.
- Todos os materiais e resíduos da prova (placas, frascos e líquidos resultantes das diferentes etapas) deverão ser tratados antes de serem eliminados. Recomenda-se autoclavá-los durante 45 minutos a 121°C a 1 atmosfera ou tratar com hipoclorito de sódio a concentração final de 5% durante 1 hora.

5. MATERIAIS FORNECIDOS NO KIT

Composição

5.1. Microplacas sensibilizadas com a proteína 3ABC **MP** 10 microplacas

Microplacas com 96 cavidades sensibilizadas com a proteína recombinante 3ABC do VFA purificada. Prontas para uso. Conserve em geladeira (2°C a 8°C).

5.2. Solução PBS – Tween 20x concentrada **PB** 2 frascos contendo 160 ml cada um

Solução PBS – Tween 20, concentrada 20 vezes, com conservante, para a preparação da solução de lavagem e de diluente de amostra/conjugado, conforme indicado nos "Procedimentos preliminares". Conserve em geladeira (2°C a 8°C).

5.3. *Escherichia coli* **EC** 1 tubo contendo 450 µl

Lisado de *Escherichia coli* para adicionar ao diluente de amostra/conjugado conforme indicado nos "Procedimentos preliminares". Conserve em geladeira (2°C a 8°C).

5.4. Leite em pó desnatado **LP** 1 bolsa plástica contendo 25 g

Leite em pó desnatado, para ser adicionado ao diluente de amostra/conjugado conforme o indicado nos "Procedimentos preliminares". Uma vez aberto o plástico, mantenha o resto do conteúdo hermeticamente fechado em geladeira (2°C a 8°C).

5.5. Soro eqüino **SE** 1 frasco contendo 45 ml

Soro eqüino irradiado com conservantes, para ser adicionado ao diluente de amostra/conjugado conforme o indicado nos "Procedimentos preliminares". Conserve em geladeira (2°C a 8°C).

5.6. Soro Controle Negativo **CN** 1 tubo contendo 300 µl

Soro bovino sem anticorpos contra o VFA, tratado com clorofórmio e BEI, com conservante. Manipule seguindo as orientações especificadas em "Incubação das amostras". Conserve em geladeira (2°C a 8°C). Centrifugue antes de usá-lo para aproveitamento total do material.

5.7. Soro Controle Padrão 1 **CP1** 1 tubo contendo 350 µl

Soro bovino com anticorpos contra a proteína 3ABC do VFA, tratado com clorofórmio e BEI, com conservante. Manipule seguindo as orientações especificadas em "Incubação das amostras". Conserve em geladeira (2°C a 8°C). Centrifugue antes de usá-lo para aproveitamento total do material.

5.8. Soro Controle Padrão 2 **CP2** 1 tubo contendo 300 µl

Soro bovino com anticorpos contra a proteína 3ABC do VFA, tratado com clorofórmio e BEI, com conservante. Manipule seguindo as orientações especificadas em "Incubação das amostras". Conserve em geladeira (2°C a 8°C). Centrifugue antes usá-lo para aproveitamento total do mateiral.

5.9. Conjugado 100x concentrado **CJ** 1 tubo contendo 1,2 ml

Anticorpos de coelho anti-IgG bovino conjugados com peroxidasa, com estabilizante. Dilua conforme indicado na Tabela II. Conserve em geladeira (2°C a 8°C).

5.10. Diluente de substrato **DS** 1 frasco contendo 120 ml

Solução de ácido cítrico em buffer fosfato com peróxido de hidrogênio, específica para a diluição do substrato. Conserve em geladeira (2°C a 8°C). Pronta para uso.

5.11. Substrato 100x concentrado **ST** 1 tubo contendo 1,2 ml

Solução de tetrametil-benzidina (TMB) em dimetilsulfóxido (DMSO), 100x concentrada. Dilua conforme indicado na Tabela II. Conserve em geladeira (2°C a 8°C).

5.12. Solução bloqueadora **SB** 1 frasco contendo 120 ml

Solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1N. Pronta para uso. Conserve em geladeira (2°C a 8°C).

5.13 Placas auxiliares **PA** 10 unidades

Microplacas com 96 cavidades para diluição prévia de controles e soros, prontas para usar. Conserve a temperatura ambiente dentro da embalagem plástica. Não reutilizar.

6. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS NÃO FORNECIDOS

6.1. Material de laboratório

- Pipeta multicanal de volume ajustável (100 µl) e micropipetas monocanal de volume ajustável (10 ou 20, 100 e 1000 µl), com precisão e exatidão verificadas. Ponteiras descartáveis adequadas para as micropipetas; verifique que as mesmas não retenham imunoglobulinas, o que pode interferir com os resultados do teste.
- Papel secante.
- Material de laboratório para preparar as soluções.
- Água deionizada e/ou destilada.
- Hipoclorito de sódio para tratar o material a descartar (materiais e soluções resultantes da prova).

6.2. Equipamentos

- Lavadora de placas manual ou automática.
- Estufa 37^0C ± $0,5^0$C.
- Leitora de microplacas com filtros para leitura a 450 e 620 nm.
- Homogeneizador tipo vórtex.
- Balança.
- Microcentrífuga tipo Eppendorf ou similar.

Seguir as instruções dos fabricantes para o uso, freqüência de calibração e manutenção.

7. MANIPULAÇÃO E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

Para a manipulação e conservação dos soros recomendamos:

- Conservá-los em geladeira (2°C a 8°C) por no máximo 7 dias; para períodos maiores, conservá-los a –20°C ± 5°C.
- Evitar repetidos ciclos de congelamento / descongelamento.
- Não usar soros contaminados ou que apresentem precipitados.
- Homogeneizar os soros antes de usá-los.

8.1. Procedimentos preliminares

- Aproximadamente uma hora antes de começar a prova retire os reagentes indicados a seguir da geladeira (Micoplacas MP 3ABC, PBS 20x, Diluente de Substrato e Solução Bloqueadora) de modo a permitir que estabilizem a temperatura ambiente (TA) 22°C – 25°C. Prepare o diluente de amostra/conjugado e a solução de lavagem 1x, deixando-os estabilizar também a TA. Após o uso, retorne o soro equino, a *E.coli* e o leite à geladeira. O substrato 100x deve estar liquido e homogêneo na hora do uso. Para tal deve ser retirado da geladeira aproximadamente 40 - 60 minutos antes do uso deixando estabilizar a TA . Retire os outros reagentes (soros padrão, soros problema e conjugado 100x) na hora de usá-los.
- Prepare a planilha da prova (Ver Anexo), levando em consideração que devem ser reservadas, no mínimo, 2 cavidades para o soro Controle Negativo (CN), 3 cavidades para o soro Controle Padrão 1 (CP1), 2 cavidades para o soro Controle Padrão 2 (CP2).
- Homogenize os reagentes antes de usá-los.
- Prepare as soluções necessárias para a prova em função do número de amostras (placas) a processar de acordo ao especificado na Tabela I:

TABELA I – Volumes de soluções a preparar em função do número de amostras

Número de amostras	Buffer de lavagem	Diluente de amostra / conjugado
1 placa = até 89 amostras	500 ml	30 ml
2 placas = até 178 amostras	1000 ml	60 ml
3 placas = até 267 amostras	1500 ml	90 ml
4 placas = até 356 amostras	2000 ml	120 ml
5 placas = até 445 amostras	2500 ml	150 ml

- Buffer de lavagem: Dilua 20 vezes com água deionizada e/ou destilada a solução PBS – Tween 20x (PB). Caso se observe precipitados na solução PB, dissolva-os em Banho Maria a 37°C ± 0,5°C antes de fazer a diluição.
- Diluente de amostras/conjugado: Para preparar 100 ml desta solução dissolva 5 g de leite desnatado (LP) em aproximadamente 50 ml de buffer de lavagem (preparado anteriormente). Adicione 10 ml de soro eqüino e 100 µl de *Escherichia coli* (EC), homogenize e complete até chegar ao volume final com buffer de lavagem (preparado anteriormente). Prepare no momento de uso o volume suficiente para cada prova e descarte o volume não utilizado no fim da prova.
- A diluição do conjugado e do substrato deve ser realizada entre 5 a 10 minutos antes do seu uso, segundo o especificado na Tabela II.

TABELA II – Preparação do conjugado e substrato em função do número de placas

Número de placas	Diluente de amostra / conjugado	Conjugado 100x	Diluente de substrato	Substrato 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. Execução do ensaio

Incubação das amostras

- Pre diluir as amostras problema e controles nas placas auxiliares fornecidas no kit. Coloque 190 µl de diluente de amostra/conjugado em todas as cavidades da placa auxiliar **PA**. Nas cavidades assinaladas para as amostras problema adicione 10 µl de cada amostra. Use uma ponteira nova para cada amostra. Homogenize as diluições. Proceda da mesma forma para os soros controle. Transfira com pipeta multicanal 100 µl das amostras pre-diluidas à placa sensibilizada, respeitando as posições das mesmas.
    - Opcional. Colocar 95 µl de diluente de amostra/conjugado em todas as cavidades. Adicione 5 µl de amostra ou soro controle (diluição final 1:20) na cavidade assinalada, seguindo a ordem estabelecida na planilha da prova. É recomendado que a terceira, e/ou quarta, réplica do CP1 seja aplicada após terem sido inoculadas todas as amostras. Utilize uma ponteira nova para cada amostra. Não devem transcorrer mais de 10 minutos entre a diluição do primeiro e do último soro, de modo a garantir a correta interpretação dos resultados.
- Sele a placa e incube a 37°C ± 0,5°C durante 30 minutos ± 30 segundos.
- Antes do fim da etapa de incubação das amostras prepare o conjugado diluído conforme as indicações da Tabela II.

Lavagem

- Uma vez concluída a etapa de incubação das amostras esvazie a placa evitando que transborde o líquido de uma cavidade para outra. Lave a placa um total de 6 vezes em 3 ciclos duplos, ou seja lave cada fileira duas vezes antes de passar para a próxima. Evite, durante a lavagem, tanto que o líquido transborde das cavidades, usando volume de ~ 0,3 ml para cada lavagem, quanto também que as agulhas da lavadora encostem na placa. A cuidadosa execução desta etapa é fundamental para se obter um bom resultado. Caso não se disponha de lavadora automática, a lavagem poderá ser realizada manualmente. No fim do ciclo de lavagem, descarte os restos de solução de lavagem batendo a placa invertida sobre papel toalha.

Incubação do conjugado

- Adicione 100 µl de conjugado diluído por cavidade. Sele a placa e incube a 37°C ± 0,5°C durante 30 minutos.
- Antes do fim da etapa de incubação do conjugado prepare o substrato-cromogênio, de acordo ao indicado na Tabela II. Caso a temperatura ambiente esteja a baixo dos 22°C, é aconselhável estabilizar o volume necessário de diluente de substrato para a prova durante 10 minutos a 37°C. Uma vez estabilizado, prepare o substrato-cromogênio e use imediatamente.
- Antes de usar o substrato concentrado verifique se está líquido e homogêneo (ponto de fusão 18°C). A solução final de substrato diluído preparada deve ser incolor ou de um amarelo bem pálido. Caso se observe uma coloração intensa descarte a solução e prepare uma nova.

Lavagem

- Proceda como indicado para a etapa anterior de lavagem.

Incubação do substrato-cromogênio

- Adicione 100 µl de substrato-cromogênio diluído a cada cavidade e incube a TA (22°C – 25°C) durante 15 minutos.
- Adicione 100 µl de solução bloqueadora a cada cavidade.

Leitura da placa

- A leitura da placa deve ser realizada até um máximo de 30 minutos após a adição da solução bloqueadora. Realize leitura com duplo filtro: 450 nm e 620 nm para correção automática de branco.

Resumo dos procedimentos do ensaio

Etapa	Volume	Procedimento
Pre diluição das amostras Dil. amostra/conjugado Controles e amostras	 190 µl 10 µl 100 µl	 Adicione em todas as cavidades da placa auxiliar. Adicione nas cavidades assinaladas e homogenize suavemente. Transfira da placa auxiliar para a placa sensibilizada.
Diluição direta (opcional) Dil. amostra/conjugado Controles e Amostra	 95 µl 5 µl	 Adicione em todas as cavidades da placa 3ABC. Adicione nas cavidades assinaladas e homogenize suavemente.
Incubação das amostras		Cubra a placa. Incube durante 30 minutos ± 30 segundos a 37°C ± 0,5°C . 2 minutos antes do início da lavagem prepare o conjugado diluído.
Lavagem	6 x ~0,3 ml	Lave em 3 ciclos duplos (total 6 vezes).
Incubação do conjugado Conjugado diluído	 100 µl	 Adicione a cada cavidade. Cubra a placa. Incube durante 30 minutos ± 30 segundos a 37°C± 0,5°C . 2 minutos antes do início da lavagem prepare o substrato diluído.
Lavagem	6 x ~0,3 ml	Lave em 3 ciclos duplos (Total 6 vezes).
Incubação do substrato Substrato diluído	 100 µl	 Adicione a cada cavidade. Incube durante 15 minutos ± 30 segundos a 22°C – 25°C (TA).
Bloqueio da reação Solução bloqueadora	 100 µl	 Adicione a cada cavidade.
Leitura da placa		Leia a absorbância a 450/620 nm em um prazo máximo de 30 minutos.

9. CÁLCULO DOS RESULTADOS

9.1. Critério de aceitação dos resultados

A prova será válida somente se os soros controle cumprirem os seguintes requisitos.

- Soro Controle negativo (CN) – O valor de absorbância de cada uma das réplicas deve ser inferior a 0,1. No caso de se trabalhar com três réplicas e uma delas resultar superior a 0,1, a mesma poderá ser desconsiderada para cálculo da média. Calcule a média com no mínimo, dois valores aceitáveis.
- Soro Controle Padrão 1 (CP1) - O valor de absorbância de cada uma das réplicas, após ter subtraído o valor de absorbância da média do controle negativo (CN), deve ser superior a 0,15. Caso após ser descontado o valor de absorbância da média do controle negativo (CN), uma das três réplicas do CP1 resultar inferior a 0,15 desconsidere o valor e calcule a média com no mínimo, dois valores aceitáveis..
- Soro Controle Padrão 2 (CP2) – Subtraia do valor de absorbância de cada réplica o valor da média do CN. Calcule a média com no mínimo, dois valores aceitáveis.
- A relação CP2/CP1 deverá ser igual a 2,1, com uma variação máxima de ± 25% (1,6 a 2,6)

9.2. Cálculo e interpretação de resultados

Expresse os resultados em relação ao Soro Controle Padrão 1 (CP1) como:

T/C = (Abs. de soro em análise – média Abs. CN) / (média CP1*)

* Calculada como referido no ponto 9.1

A amostra deverá ser considerada:

- <u>não reativa</u> para valores de T/C < 0,8.
- <u>inconclusiva ou suspeita</u> para valores de 0,8 ≤ T/C < 1.
- <u>reativa</u> para valores de T/C ≥ 1.

<u>Obs.: Caso a prova seja utilizada para análise comparativa de amostras coletadas de um mesmo animal recomendamos que o processamento das mesmas seja realizado em uma mesma placa.</u>

9.3. Controle de qualidade interno

A fim de avaliar a execução da prova no seu laboratório no decorrer do tempo em suas condições locais se recomenda entre outros:

a) Uso regular de material de referência certificado e/ou um controle de qualidade interno utilizando materiais de referência secundários.

b) Participação em comparações interlaboratoriais.

c) A confecção de curvas com os valores de absorbância das réplicas (duplicados/triplicados/etc.) dos soros controle (CN, CP1 e CP2), assim como das médias calculadas para os mesmos, obtidas diariamente, de acordo às especificações do item 9.1. É recomendado o envio a PANAFTOSA dos resultados de absorbância dos soros controle de todas as provas processadas para acompanhamento.

No Certificado de Análise, que se anexa a cada lote, constam as especificações da PANAFTOSA para o trabalho com controles. Cabe destacar que no PANAFTOSA se trabalha com diluição prévia das amostras em placa auxiliar, o que permite a aplicação das mesmas na placa 3ABC num período de tempo não significativo se comparado à duração da etapa de incubação das amostras. Tais valores de especificação são meramente orientativos.

10. CONSIDERAÇÕES GERAIS

10.1. Eventuais problemas e possíveis causas

- ausência total de reação ou coloração extremamente tênue – verifique a qualidade da água; mantenha o excedente de conjugado e substrato diluído até o fim da prova de modo a confirmar o desenvolvimento de cor misturando ambas as soluções. Controle possíveis retenções em ponteiras.
- soros controle fora de faixa – verifique a temperatura da sala e da estufa; controle que os tempos de incubação sejam os indicados, confira o estado de calibração das micropipetas; verifique a qualidade da lavagem do material ou a qualidade do material descartável.
- resultados não reprodutíveis - verifique o estado de calibração das micropipetas; certifique-se de que os procedimentos de lavagem sejam os recomendados. Controle que não haja contaminação química ou microbiológica dos tubos e válvulas utilizados no sistema de lavagem. Verifique o estado de calibração da leitora de microplacas. Verifique a qualidade da lavagem do material ou a qualidade do material descartável.

10.2. Considerações metodológicas

Como a prova é baseada na detecção de anticorpos, deve se considerar que a presença dos mesmos não necessariamente indica a presença do vírus, já que os mesmos podem refletir não apenas uma infecção presente, mas também uma infecção passada. Também é importante salientar o fato de que existe um intervalo temporal entre a exposição ao vírus e a formação de anticorpos. Ensaios realizados com o NCPanaftosa Prova de Triagem – Bovino em animais experimentalmente infectados permitiram estabelecer que o processo de soro conversão pode ser detectado a partir de 7 dias pós-infecção.

11. DESCRIÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO DA PROVA

- A especificidade, estimada com soros de animais de áreas livres sem vacinação da América do Sul e da Europa resultou em valores que excederam os 98%.
- A sensibilidade calculada para animais com infecção persistente comprovada, estabelecida de forma experimental, e em animais de campo não vacinados, da América do Sul e da Europa atingiu 100%. Para animais vacinados e

com infecção persistente comprovada a sensibilidade se aproxima de 100%. No entanto, quando se avaliaram animais com infecção persistente não comprovada, e provavelmente sem risco de transmissão do vírus (animais com resultados positivos para PCR ou isolamento viral apenas em raras ocasiões e em períodos próximos à exposição) os valores diminuem (aproximadamente 97,2%).

- Para animais vacinados de áreas livres com vacinação sistemática, os valores de especificidade diagnóstica podem variar conforma o grau de pureza das vacinas no que se refere ao conteúdo de PNCs, assim como em função ao número de vacinações. Nesse sentido se recomenda o uso de vacinas que não induzam resposta de anticorpos anti-PNC em animais vacinados / revacinados. Em geral, vacinas purificadas mediante métodos convencionais não induzem resposta de anticorpos que possa interferir na avaliação dos levantamentos soro epidemiológicos, embora seja possível observar o deslocamento dos valores negativos para o valor de corte, com valores de especificidade próximos 97% em animais < 2 anos.

- É recomendado o uso da prova confirmatória (NCPanaftosa Prova Confirmatória – Bovino) para trabalhar com valores de especificidade maiores, de forma tal a não comprometer o valor preditivo positivo em áreas de baixa prevalência.

- É importante destacar os resultados obtidos para modelos experimentais de bovinos da PANAFTOSA, que permitiram o estudo pareado de líquido esofágico-faríngeo (LEF) e soros. Estas amostras foram coletadas de 85 bovinos (37 não vacinados e 48 vacinados), infectados ou expostos ao VFA sob condições controladas. A coleta das amostras se realizou durante o estado comprovado de infecção (isto é, prévio à última recuperação viral positiva a partir do LEF). Independentemente do estado de vacinação, os resultados sugerem que a sensibilidade diagnóstica do sistema NCPanaftosa (Provas de Triagem/Confirmatória) relativa às amostras LEF positivas (n = 436) é de 100%, (amostras positivas para LEF eram aquelas em que foi possível isolar vírus). No entanto, a sensibilidade de isolamento por LEF relativa a resultados positivos mediante o sistema NCPanaftosa (Provas de Triagem/Confirmatória) (n = 893) para estes animais só atingiu valores de 48,8%.

- Um melhor aproveitamento dos resultados pode ser obtido mediante a construção de gráficos de distribuição de frequência de reatividades de anticorpos resultando em perfis que refletem populações com diferentes situações epidemiológicas.

- Nas referências bibliográficas se exemplificam perfis obtidos para populações representativas das seguintes situações epidemiológicas:

  - populações de animais de áreas livres sem vacinação,
  - animais experimentalmente infectados,
  - populações de animais envolvidos em surtos de febre aftosa,
  - populações de animais menores de 2 anos de áreas com vacinação sistemática sem doença clínica nos últimos 4 anos,
  - populações de animais maiores de 2 anos de áreas com vacinação sistemática sem doença clínica nos últimos 4 anos.

12 . BIBLIOGRAFIA

1. Bergmann I.E., Augé de Mello P., Neitzert E., Beck E & Gomes I. (1993) Diagnosis of persistent aphtovirus infection and its differentiation from vaccination response in cattle by use of enzyme-linked immunoeletrotransfer 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 Virológicos 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 Virológicas 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 Virológicos 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.

Organização Pan-Americana da Saúde
Escritório regional da Organização Mundial da Saúde

Planilha da Prova NCPanaftosa Prueba Tamiz-Bovino

Data: _____ Lote: _____

PBS Tween 20X: _____ Conjugado: _____
Dil. Amostra/conjugado: _____ Substrato: _____

Incubação das amostras: Hora início: _____ Hora término: _____
Incubação do conjugado: Hora início: _____ Hora término: _____
Incubação do substrato: Hora início: _____ Hora término: _____
Leitura da placa: Hora: _____

Soros

	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												

_____