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 Confirmatoria – 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 las proteínas 3ABC, 3D, 2C, 3B y 3A del Virus de la Fiebre Aftosa suficientes para el estudio de 208 muestras de suero bovino / bubalino (*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. REACTIVOS SUMINISTRADOS EN EL KIT 4
6. EQUIPOS Y MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS 6
   6.1 Material de laboratorio 6
   6.2. Equipos 6
7. MANEJO Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS 6
8. PROCEDIMIENTO 7
   8.1. Procedimientos preliminares 7
      TABLA I – Volúmenes a preparar en función del número de muestras 7
      TABLA II – Preparación del conjugado y sustrato en función del número de geles 8
   8.2. Ejecución del ensayo 8
      Resumen de los procedimientos del ensayo 10
9. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS 11
   9.1. Criterios de validación del gel 11
   9.2. Análisis de los resultados 11
   9.3. Control de calidad interno 11
10. CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS 12
   10.1 Eventuales problemas y posibles causas 12
   10.2 Consideraciones metodológicas 12
11. DESCRIPCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO DE LA PRUEBA 12
12. BIBLIOGRAFÍA 14
13. ANEXO: Protocolo de la reacción 15

1. NOMBRE Y USO RECOMENDADO

El kit denominado NCPanaftosa Prueba Confirmatoria - Bovino, está integrado por un conjunto de reactivos necesarios para realización de ensayo inmunoenzimático que permite la detección *in vitro* de anticuerpos contra las proteínas no capsidales (PNC) 3ABC, 3D, 2C, 3B y 3A del Virus de la Fiebre Aftosa (VFA). Este ensayo que consiste en una prueba de EITB (Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot) fue padronizado como prueba confirmatoria de un sistema que usa el kit NCPanaftosa Prueba Tamiz - Bovino como prueba tamiz. Su uso está recomendado en la vigilancia activa de la Fiebre Aftosa en poblaciones bovinas menores de 2 años. El kit también puede ser usado con sueros de búfalo (*Bubalus bubalis*) en las mismas condiciones que para el bovino.

2. INTRODUCCIÓN

La Fiebre Aftosa, enfermedad infecciosa que afecta a 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, inclusive estando vacunados, que se puede hacer persistente, y de duración variable. 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 las proteínas no capsidales 3ABC, 3D, 2C, 3B y 3A del VFA, como marcadores 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 de bovino y/o de bubalino); 2. Incubación del conjugado y 3. Incubación del sustrato. Siguen a las tres etapas ciclos de lavado.

Incubación de las muestras: Las proteínas 3ABC, 3D, 2C, 3B y 3A inmovilizadas en la tira de nitrocelulosa al entrar en contacto con la muestra reaccionarán 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 de las muestras, quedando sólo los anticuerpos específicos adheridos a la tira de nitrocelulosa a través de las proteínas específicas.

Incubación del conjugado: en esta etapa se agrega el conjugado (anticuerpos anti-IgG de bovino con fosfatasa alcalina), que se unirá específicamente al 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 esta etapa.

Incubación del sustrato: en esta tercera etapa se adiciona el substrato NBT – BCIP sobre el cual actúa la enzima fosfatasa del conjugado. Como resultado de la acción de la misma se observará el surgimiento de bandas color violáceo en la tira en

donde los antígenos hayan retenido anticuerpos específicos y consecuentemente conjugado. Por último la reacción es interrumpida al lavarse las tiras de nitrocelulosa con agua deionizada y/o destilada.

La lectura de las tiras se realiza por comparación de la intensidad del color de las bandas de las muestras frente a las del control padrón 1 (CP1), recomendado como valor de corte (cut-off) para la prueba. Esto permite clasificar los sueros problema.

4. CUIDADOS Y PRECAUCIONES

- Todos los componentes del kit deben conservarse en heladera (2^0C a 8^0C). Recomendamos no usar equipos de tipo "frost free".
- Conservar los materiales en sus envases originales.
- Respetar el plazo de validez que figura en la etiqueta de la caja
- No usar ni mezclar componentes de otros kits, lotes o fabricantes.
- Seguir estrictamente el procedimiento descrito para 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. En casos de alteraciones entrar en contacto con PANAFTOSA.
- Manipular las tiras de nitrocelulosa siempre con pinza plástica, evitando contacto directo con las manos.
- Manipular las muestras y los sueros controles cumpliendo BPL.
- Todos los materiales y residuos de la prueba (cubas, frascos y líquidos resultantes de las diferentes etapas) deberán ser tratados antes de ser eliminados. Se recomienda autoclavar durante 45 minutos a 121 ^{0}C a 1 atmósfera o tratar con hipoclorito de sodio a concentración final de 5% durante 1 hora.

5. REACTIVOS SUMINISTRADOS EN EL KIT

Composición

5.1. Tiras sensibilizadas **NC** 8 geles compuestos por 29 tiras c/u

Tiras de nitrocelulosa sensibilizadas con 20 ng/mm de cada una de las proteínas purificadas 3ABC, 3D, 2C, 3B y 3A, obtenidas por ingeniería genética. Estas proteínas son separadas en función de su peso molecular (gel de SDS-PAGE) y transferidas a las tiras de nitrocelulosa, donde se adhieren como bandas discretas. Las tiras están listas para su uso.

5.2. Buffer lavado 10x concentrado **BL** 3 frascos conteniendo 200ml cada uno

Solución tampón con Tween 20, concentrada 10 veces. Específica para la preparación de la solución de lavado y del buffer de saturación, que se preparan según lo indicado en los "Procedimientos preliminares". Conservar en heladera (2^0C a 8^0C).

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

Lisado de *Escherichia coli* para adicionar al buffer de saturación según lo indicado en los "Procedimientos preliminares". Conservar en heladera (2^0C a 8^0C).

5.4. Leche en polvo descremada **LP** 1 bolsa plástica conteniendo 25g

Leche en polvo descremada, para adicionar al buffer de saturación según lo indicado en los "Procedimientos preliminares". Una vez abierta la bolsa plástica, mantener el resto del contenido herméticamente cerrado en heladera (2^0C a 8^0C).

5.5. Suero Control Negativo **CN** 1 tubo conteniendo 150µl

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 (2^0C a 8^0C). Centrifugar antes de su uso para el aprovechamiento total del material.

5.6. Suero Control Padrón 1 **CP1** 1 tubo conteniendo 150µl

Suero bovino con bajo título de anticuerpos contra las proteínas 3ABC, 3D, 2C, 3B y 3A del VFA, tratado con cloroformo y BEI, con conservante. Manipular según lo indicado en "Incubación de las muestras". Conservar en heladera (2^0C a 8^0C). Centrifugar antes de su uso para el aprovechamiento total del material.

Padrón validado contra un standard primario que corresponde al suero de un animal a 714 dpi (días post-infección) experimental y del cual no se recuperaba virus del LEF (Líquido esofágico faríngeo) desde los 328 dpi. La reactividad de este suero equivale a la máxima reactividad de fondo observada individualmente para cada uno de los cinco antígenos en animales no vacunados en regiones libres de fiebre aftosa.

5.7. Suero Control Padrón 2 **CP2** 1 tubo conteniendo 150µl

Suero bovino con título medio de anticuerpos contra las proteínas 3ABC, 3D, 2C, 3B y 3A del VFA, tratado con cloroformo y BEI, con conservante. Manipular según lo indicado en "Incubación de las muestras". Conservar en heladera (2^0C a 8^0C). Centrifugar antes de su uso para el aprovechamiento total del material.

Padrón validado contra un standard primario que corresponde al suero de un animal no vacunado a 714 dpi experimental y del cual se recuperaba ocasionalmente virus del LEF. La reactividad de este suero equivale a las mayores reactividades observadas para los cinco antígenos en regiones de muy bajo riesgo epidemiológico (tres años después del último brote).

5.8. Conjugado 100x concentrado **CJ** 1 tubo conteniendo 1,5ml

Anticuerpos de conejo anti-IgG bovino conjugados con fosfatasa alcalina, con estabilizantes. Diluir según lo indicado en la Tabla II . Conservar en heladera (2^0C a 8^0C).

5.9. Diluyente de sustrato **DS** 1 frasco conteniendo 130ml

Solución tampón específica para la dilución del NBT y BCIP. Conservar en heladera (2^0C a 8^0C). Lista para su uso. Usar según lo indicado en la Tabla II.

5.10. NBT (Nitro Blue Tetrazolium) **NB** 1 tubo conteniendo 0,88ml

Solución 5% de NBT en 70% de Dimetilformamida. Conservar en heladera (2^0C a 8^0C). Preparar el volumen necesario de substrato según lo indicado en los "Procedimientos preliminares" .

5.11. BCIP ([4] 5-Bromo 4-Chloro 3-Indolyl Phosphate) **BC** 1 tubo conteniendo 0,44 ml

Solución 5% de BCIP en 100% de Dimetilformamida. Conservar en heladera (2^0C a 8^0C). Preparar el volumen necesario de substrato según lo indicado en los "Procedimientos preliminares". La solución pude presentar un precipitado el cual no necesita ser solubilizado antes del uso.

6. EQUIPOS Y MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

6.1 Material de laboratorio

- Micropipetas de volumen ajustable (10 ó 20, 100 y 1000 ul), con precisión y exactitud verificadas. Punteras descartables adecuadas a las micropipetas. Garantizar que las mismas no retengan anticuerpos contra las proteínas 3ABC, 3D, 2C, 3B e 3A.
- Bandejas de incubación con ocho canaletas. (Accutran Mini – Incubation Trays – Bio-Rad # catálogo – 170-3902 y 170-3903 o similares)
- Piceta.
- Material de laboratorio (probetas, frascos) 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

- Agitador tipo rocker oscilante (Hoefer PR50 o Thomas Scientific # catálogo 8292-B76).
- Estufa 37 °C
- Homogeneizador tipo vórtex.
- Bomba de vacío (opcional).
- 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 (2^0C a 8^0C) no más de 7 días; para períodos mayores conservar a -20^0C ± 5^0C.
- Evitar repetidos ciclos de congelamiento / descongelamiento.
- No usar sueros contaminados o que presenten material precipitado.
- Homogeneizar los sueros antes de usarlos.

8.1. Procedimientos preliminares

- Aproximadamente una hora antes de comenzar la prueba, retirar los siguientes reactivos de la heladera: tiras sensibilizadas, buffer de lavado 10x y diluyente de sustrato para permitir que se estabilicen a temperatura ambiente (TA) 22^{0}C – 25 ^{0}C. Preparar el buffer de lavado 1x y el buffer de saturación, dejándolos estabilizar también a temperatura ambiente. Retirar los otros reactivos (sueros padrones, *E. coli*, conjugado 100X, NBT, BCIP) en el momento de su uso.
- Preparar el protocolo de reacción de la prueba, teniendo en cuenta que deben reservarse 3 tiras de cada gel para los sueros controles (CN, CP1 y CP2). Los controles deben ser siempre repetidos en cada gel y para cada prueba, ya que los resultados deben ser siempre interpretados por comparación de la reactividad del suero problema con la del control CP1, procesado en el mismo gel y en la misma prueba.
- Se recomienda homogeneizar los reactivos antes de su uso.
- Preparar las soluciones necesarias para la prueba en función del número de muestras a procesar siguiendo lo especificado en la Tabla I.

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

Número de muestras	Buffer lavado 1x	Buffer de saturación
1 gel Hasta 26 muestras + 3 sueros controles	500 ml	50 ml
2 geles Hasta 52 muestras + 6 sueros controles	1000 ml	100 ml
3 geles Hasta 78 muestras + 9 sueros controles	1500 ml	150 ml

- Buffer de lavado 1x – diluir 10 veces con agua deionizada y/o destilada la solución buffer de lavado 10 x (**BL**). De observarse precipitado, disolverlos entibiando la solución en Baño María a 37 ^{0}C ± 0,5^{0}C antes de preparar la dilución.
- Buffer de saturación – para preparar 50 ml de esta solución, disolver 2,5g de leche descremada (**LP**) en aproximadamente 30 ml de agua deionizada y/o destilada. Adicionar 5 ml de buffer de lavado 10 x (**BL**), 50µl de *Escherichia coli* (**EC**), homogeneizar y llevar a volumen final de 50 ml con agua deionizada y/o destilada. Preparar en el momento de uso un volumen suficiente para cada prueba, descartando el volumen no utilizado al final de la prueba.
- La dilución del conjugado y del sustrato debe realizarse 5 - 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 geles

Número de muestras	Buffer de saturación	Conjugado 100x	Diluyente de substrato	NBT	BCIP
1 gel Hasta 26 muestras + 3 sueros controles	18,5 ml	185 µl	15,5 ml	110 µl	55 µl
2 geles Hasta 52 muestras + 6 sueros controles	36 ml	360 µl	31 ml	220 µl	110 µl
3 geles Hasta 78 muestras + 9 sueros controles	54 ml	540 µl	45 ml	320 µl	160 µl

8.2. Ejecución del ensayo

Saturación de las tiras

- Colocar una tira en cada una de las canaletas de las bandejas usando pinza plástica. Adicionar 0,8ml de buffer de saturación en cada canaleta, verificar que las tiras queden bien sumergidas y con la numeración visible al operador.
- Colocar las bandejas sobre el agitador y dejar incubando durante 30 minutos a TA. La velocidad del agitador debe ser de 6 ciclos oscilatorios (ida y vuelta) / minuto (número 5 del agitador). Esta velocidad debe mantenerse durante toda la prueba.

Incubación de las muestras

- Adicionar a los 0,8 ml de buffer de saturación 4µl de la muestra o suero control (dilución final 1:200) de acuerdo al orden establecido en el protocolo de prueba.

  Obs. Para permitir que la reacción se inicie simultáneamente en todas las canaletas, posicionar el agitador durante la adición de los sueros de tal forma que las bandejas queden inclinadas en un ángulo de aproximadamente 30^0. Posicionar las tiras en la parte superior de la canaleta para que no tengan contacto con el buffer en la parte inferior, donde se adicionan las muestras y los sueros controles.

- Incubar con agitación durante 60 minutos a TA. Verificar que las tiras estén bien sumergidas y con el lado numerado de la tira visible al operador.

Lavado

- Concluida la etapa de incubación eliminar el buffer de saturación inclinando la bandeja, evitando que trasborde líquido de una canaleta hacia otra. Invirtiendo la bandeja secarla muy bien sobre papel toalla. Lavar las canaletas y tiras con abundante buffer de lavado 1x usando una piceta. Luego descartar este buffer de lavado y volver a lavar al menos 2 veces del mismo modo. Secar las bandejas con papel absorvente. Adicionar a continuación 1 ml de buffer de lavado 1x por canaleta y dejar agitando durante 5 minutos a TA. Repetir dos veces este último procedimiento de lavado. Luego del último lavado secar muy bien las bandejas golpeándolas invertidas sobre papel absorvente.

Alternativa: Aspirar el buffer de saturación usando sistema de vacío y a continuación lavar las tiras con 1 ml de buffer de lavado 1x, aspirar y volver a lavar al menos 2 veces del mismo modo. Finalmente adicionar 1 ml de buffer de lavado 1x y dejar agitando 5 minutos, repetir este procedimiento 2 veces más.

Incubación del conjugado

- Antes de finalizar la etapa de lavado, diluir el conjugado según lo indicado en la Tabla II y aplicar 0,6 ml por canaleta, posicionando las bandejas según lo indicado en "Incubación de las muestras" y verificar nuevamente que las tiras estén completamente sumergidas y el lado numerado de las tiras sea visible.
- Incubar con agitación durante 60 minutos a TA (22°C-25°C).

Lavado

- Proceder del modo indicado para el lavado de la etapa anterior.

Incubación del sustrato - cromógeno

- Antes de finalizar la etapa de lavado, preparar el sustrato – cromógeno (NBT/BCIP) según lo indicado en la Tabla II, adicionando con cuidado y lentamente primero el NBT al buffer substrato y luego el BCIP. Aplicar 0,5 ml por canaleta posicionando las bandejas según lo indicado para la "Incubación de las muestras". Verificar que las tiras estén completamente sumergidas y el lado numerado de las tiras esté hacia arriba, visible al operador.
- Incubar con agitación a TA (22°C-25°C) hasta que la tira del CP1 desarrolle cinco bandas apenas visibles, aproximadamente 15 minutos.

Interrupción de la reacción

- Descartar (o aspirar) el substrato – cromógeno y lavar las tiras con abundante agua deionizada y/o destilada. Por último secar muy bien las bandejas invirtiéndolas y golpeándolas sobre papel secante.
- Dejar secar las tiras (aproximadamente dos horas a TA) dentro de las bandejas o bien con ayuda de una pinza plástica depositarlas sobre papel de filtro. Una vez secas se recomienda pegarlas en el protocolo de reacción (Ver Anexo) con cinta adhesiva transparente, posicionándolas de manera que el extremo donde se encuentra el número del gel y su marca de color queden hacia el lado derecho del espacio disponible en el protocolo de reacción. De esta forma las bandas quedarán ordenadas para su análisis de izquierda a derecha de la siguiente forma: 3A, 3B, 2C, 3D y 3 ABC.

> Obs. La lectura de los resultados no precisa ser inmediata, sin embargo conviene analizar y registrar las bandas observadas hasta no más de una semana después de realizada la prueba. Con el tiempo la coloración se atenúa. Se recomienda el registro de las pruebas utilizando un sistema captador de imágenes a color (fotocopia, scanner), controlando que la copia sea fiel al original.

Resumen de los procedimientos del ensayo

Etapa	Volumen	Procedimiento
Saturación de las tiras Buffer de saturación 1x	0,8 ml	Adicionar en cada canaleta de la bandeja. Incubar durante 30 minutos a TA (22°C-25°C) con agitación.
Aplicación e incubación de las muestras y sueros controles	4 µl	Adicionar en cada canaleta de la bandeja de acuerdo al protocolo de la prueba. Incubar durante 60 minutos a TA (22°C-25°C) con agitación.
Lavado Solución lavado 1x	3 x 1 ml	Lavar abundantemente cada canaleta con piceta. Lavar cada canaleta 3 veces con 1 ml durante 5 minutos con agitación. Por último secar las bandejas.
Aplicación e incubación del conjugado Conjugado diluido	0,6 ml	Preparar el conjugado 1x Adicionar 0,6 ml en cada canaleta. Incubar durante 60 minutos a TA (22°C-25°C) con agitación.
Lavado Solución lavado 1x	3 x 1 ml	Lavar abundantemente cada canaleta con piceta. Lavar cada canaleta 3 veces con 1 ml durante 5 minutos con agitación. Por último secar las bandejas.
Aplicación e incubación del sustrato Sustrato diluido	0,5 ml	Preparar el sustrato diluido. Adicionar 0,5 ml en cada canaleta. Incubar aproximadamente durante 15 minutos a TA(22°C-25°C) con agitación.
Detención de la prueba		Lavar las tiras con abundante agua deionizada y/o destilada y dejar secar. Pegar las tiras en el protocolo de reacción.

9.1. Criterios de validación del gel

El gel será válido cuando los sueros controles presenten los siguientes resultados:

- Control Negativo (**CN**) – no debe presentar banda de reacción para ninguna de las cinco proteínas o estas deben ser apenas apreciables.
- Control Padrón 1 (**CP1**) – debe presentar bandas muy tenues y de intensidad homogénea para cada uno de las cinco proteínas.
- Control Padrón 2 (**CP2**) – debe presentar bandas muy visibles para cada uno de las cinco proteínas con intensidades superiores a las del CP1.

Cuando los sueros controles cumplan las condiciones detalladas el gel podrá ser considerado válido y se podrá proceder al análisis de los resultados.

9.2. Análisis de los resultados

La reactividad de cada suero deberá ser analizada visualmente por comparación con la reactividad del suero control **CP1** del mismo gel corrido en la misma prueba evaluando comparativamente la intensidad de cada una de las cinco bandas.

La muestra deberá ser considerada **No Reactiva** si se observa alguna de estas condiciones:

- Ausencia total de reacción para las cinco proteínas ó,
- Reactividad con intensidad menor a la de la banda correspondiente del **CP1** para cada uno de las cinco proteínas, individualmente o en conjunto ó,
- Reactividad igual o mayor a la de la banda correspondiente del **CP1** para un máximo de dos proteínas simultáneamente.

La muestra deberá ser considerada **Reactiva** si se observa:

- Reactividad para 3ABC, 3D, 3B y 3A (± 2C) con intensidad igual o superior a la de la banda correspondiente al suero control **CP1**.

El resultado deberá ser considerado **Indeterminado**:

- Cuando el padrón de bandas obtenido no se ajuste a los parámetros definidos para muestras reactivas o no reactivas.

<u>Obs: 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 un único gel.</u>

9.3. Control de calidad interno

Con la finalidad de evaluar la ejecución de la prueba en su laboratorio a lo largo del tiempo en sus condiciones locales se recomienda entre otros:

a) Uso regular de material de referencia certificado y/o um control de calidad interno utilizando materiales de referencia secundarios.

b) Participación en comparaciones interlaboratoriales.

10. CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS

10.1 Eventuales problemas y posibles causas

● ausencia total de reacción o coloración extremadamente tenue – Verifique la calidad del agua; mantenga el excedente de conjugado y substrato después de finalizar la prueba para realizar prueba de viraje de color mezclándolos en un tubo de ensayo. Controlar posibles retenciones en punteras. Verifique que la temperatura de la sala esté dentro de lo recomendado (22°C-25°C).

● sueros controles fuera del rango – Verifique la temperatura de la sala; controle que los tiempos de incubación sean los recomendados; confiera el estado de calibración de las micropipetas; verifique la calidad del lavado del material especialmente cuando reusa las bandejas; verifique la velocidad del agitador, asegúrese que la reacción es interrumpida ni bien las bandas del control CP1 comienzan a hacerse visibles. Evite el uso de refrigeradores de tipo "frost free" para almacenar los reactivos por periodos prolongados.

● resultados no reproducibles – verifique el estado de calibración de las micropipetas; certifíquese que los procedimientos de lavado sean los recomendados. Verifique la calidad del lavado del material, y la calidad del material descartable. Evite el uso de refrigeradores de tipo "frost free" para almacenar los reactivos por periodos prolongados.

● bandas con aspecto difuso – Verifique la velocidad del agitador

10.2 Consideraciones metodológicas

Esta prueba diagnóstica está basada en la detección de anticuerpos. Debe tenerse en cuenta que la presencia de los mismos no necesariamente indica presencia del virus, ya que pueden estar reflejando también infección pasada (memoria inmunológica). Asimismo, es importante resaltar que existe un intervalo temporal entre la exposición al virus y la formación de anticuerpos. Pruebas realizadas con el NCPanaftosa Prueba Confirmatoria - 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 del sistema, estimada con animales vírgenes, provenientes de áreas libres sin vacunación de América del Sur y Europa resultó en valores que excedieron el 99%

- La sensibilidad calculada para animales con comprobada infección persistente, establecida en forma experimental y en animales de campo no vacunados, en América del Sur y Europa llega al 100%. Para animales vacunados y con comprobada infección persistente, la sensibilidad también llega a 100%.

- En animales vacunados en áreas libres con vacunación sistemática, los valores de especificidad diagnóstica para el sistema superan el 99% en animales < 2 años. Es importante recordar que estos valores pueden variar según la pureza de las vacunas en relación a su contenido de proteínas no capsidales (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 una respuesta de anticuerpos que pueda interferir con la evaluación de los muestreos.

- Cabe mencionar los resultados de modelos bovinos experimentales de PANAFTOSA en los cuales se estudiaron muestras pareadas de líquido esofágico-faríngeo (LEF) y sueros. Estas fueron colectadas de 85 bovinos (37 no vacunados y 48 vacunados), infectados o expuestos al VFA bajo condición controlada. La colecta de las muestras se realizó **durante un comprobado estado de infección**. Independientemente del estado de vacunación, los resultados sugieren que la sensibilidad diagnóstica del sistema NCPanaftosa (Pruebas Tamiz/Confirmatoria) **relativa** a muestras LEF positivas (n = 436) es 100%, (muestras positivas a LEF eran aquellas en las que el virus pudo ser aislado). En cambio, la sensibilidad de aislamiento por LEF **relativa** a resultados positivos mediante NCPanaftosa (Pruebas Tamiz/Confirmatoria) (n = 893) en estos animales solo alcanzó valores de 48,8%, en estos animales.

- En las referencias bibliográficas se ejemplificaron los resultados obtenidos para poblaciones bovinas 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. BIBLIOGRAFÍA

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. & Falczk (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 Organization for Animal Health. (OIE). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 2.1.5. (2008), Paris.

Organización Panamericana de la Salud
Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud

Planilla de Prueba NCPanaftosa confirmatorio Bovino

Fecha: _____ Lote: _____

Obs.	Origen	Suero	NCPanaftosa Confirmatorio Bovino	3A	3B	2C	3D	3ABC	EITB	ELISA