

Informe Anual - 2003

LABORATORIO



CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA

Salud Pública Veterinaria - OPS/OMS

INFORME ANUAL 2003

LABORATORIO



CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA
Unidad de Salud Pública Veterinaria – OPS/OMS

CONTENIDO

Resumen	5
Detalle de las actividades	7
1. Diagnóstico y caracterización seroepidemiológica	7
2. Investigación y desarrollo	9
3. Sistemas de calidad de servicios	16
4. Eventos internacionales	17
5. Capacitaciones y discusiones técnicas	19
6. Difusión de información	22
7. Suministro de insumos	23

INFORME ANUAL 2003

LABORATORIO

RESUMEN

Durante el período de Enero a Diciembre del 2003 el laboratorio fortaleció las actividades relacionadas al diagnóstico de emergencia y vigilancia activa, incluyendo instrumentos para la investigación de emergencias, dando continuidad a la optimización de los sistemas de control de gestión y de definición de normas para garantía de calidad diagnóstica y acreditación. Asimismo, continuó con las actividades tendientes a establecer las redes de laboratorio en zoonosis. El área de seroepidemiología se vio fortalecida a partir de la incorporación al equipo del laboratorio de un profesional nacional, como consultor en producción de insumos biotecnológicos y en diagnóstico seroepidemiológico. Las técnicas de diagnóstico que requieren la manipulación de virus vivo continúan siendo ejecutadas en las instalaciones del LAPA-Belem, DDA/MAPA, Brasil hasta que sea construido el laboratorio NB3A en PANAFTOSA – OPS/OMS.

Se destacaron las siguientes actividades:

- Se continuó con la gestión del sistema de calidad, destacándose la implementación de los registros de uso, verificación y mantenimiento de todos los equipos del laboratorio, siguiendo las normas definidas para su gerenciamiento. Fue redefinido el enfoque para el ingreso de materiales y registros correspondientes y se ha elaborado y distribuido a los países el documento sobre colecta y envío de muestras.
- Fueron analizados y optimizados los enfoques y esquemas generales para validación y certificación de pruebas de diagnóstico y para la garantía de su calidad, aplicando el modelo a los tests que conforman el sistema I-ELISA 3ABC / EITB. Asimismo, se han reforzado los enfoques de control de calidad interno y externo para promover un desempeño armonizado de dichas pruebas en PANAFTOSA - OPS/OMS y en los diferentes laboratorios de la región.
- Se ha continuado con los esfuerzos tendientes a la constitución de una red de referencia distribuida en zoonosis, mediante el análisis y evaluación de las encuestas realizadas, las que permitieron identificar las potenciales contribuciones de los distintos países a esta red y su interés en participar.
- En respuesta a la VIII Recomendación de la III Reunión Extraordinaria de la COSALFA, de implementar un sistema de auditorías externas, coordinadas por PANAFTOSA - OPS/OMS, como instrumento para evaluar el proceso de garantía de calidad de los Servicios Veterinarios en el Cono Sur, decisión ratificada en la VII Resolución de la XXVIII COSALFA y en la XII RIMSA, fueron unificadas las encuestas para la evaluación de los laboratorios de la región.

- Considerables avances se han conseguido en lo que se relaciona a seroepidemiología para vigilancia activa. Dando respuesta a las recomendaciones del seminario internacional pre COSALFA sobre “Uso de herramientas serológicas y virológicas en la vigilancia activa de la fiebre aftosa” realizado en Santiago, Chile en Marzo, fueron priorizadas las actividades tendientes a armonizar el uso y desempeño de pruebas serológicas para vigilancia activa en nuestra región.
- En respuesta a la resolución II y VI de la XXX COSALFA, ratificada en la IX COHEFA se destaca el avance realizado y los desarrollos para consolidar la producción en gran escala de kits completos en PANAFTOSA - OPS/OMS de las pruebas que conforman el sistema I-ELISA 3ABC / EITB y el desarrollo de las estrategias para el control de calidad y trazabilidad de las diferentes etapas del proceso de producción y de producto final.
- Asimismo, se fortalecieron los nexos de cooperación con otros organismos internacionales a fin de armonizar el desempeño con otros laboratorios de referencia internacional mediante la participación en grupos consultivos de OIE, IAEA y FAO.
- Se elaboró y distribuyó a todos los servicios nacionales de la región un proyecto multicéntrico que tiene como principal objetivo estudiar el establecimiento del estado portador bajo diferentes condiciones inmunológicas y epidemiológicas y de establecer la capacidad infecciosa de portadores en función del tiempo postinfección en diferentes situaciones.
- Se dio continuidad al proyecto DDA/CAS/ PANAFTOSA - OPS/OMS, a partir del desarrollo de métodos para detección de proteínas no capsidales en suspensiones virales destinadas a vacunas y la correlación entre la presencia de las mismas con la inducción de anticuerpos en animales inmunizados según condiciones normales y forzadas. Se completa la segunda fase del mencionado proyecto, que llevó a una mejora considerable en los diferentes laboratorios de Brasil, en lo que se refiere a la eliminación de proteínas no capsidales de las suspensiones virales destinadas a la producción de las vacunas que podrían llevar a la inducción de interferencias en el sistema diagnóstico,
- Se encuentra en proceso de validación final el sistema I-ELISA 3ABC / EITB para uso en otras especies diferentes que bovino.
- En lo que hace relación a epidemiología molecular, se consolidó y publicó el banco de datos genético de cepas del VFA de referencia para la región, que sirvió de base para establecer las relaciones genéticas de las cepas causantes de la emergencia sanitaria del Cono Sur y se fortaleció el banco de datos de la región andina. También es importante destacar la caracterización genética de aislamientos virales de cepas circulantes en Bolivia entre los años de 2000-2002, de vital importancia en los estudios epidemiológicos en la región. Un gran impulso será otorgado a esta área a partir de la compra reciente de secuenciador automático. Esto permitirá inclusive dar apoyo a los países de la región en la caracterización molecular de otros agentes vesiculares y enfermedades zoonóticas.

- Otra importante actividad fue la transferencia del cepario a un laboratorio de bioseguridad.
- Se realizaron importantes avances en la implantación de la técnica de inmunohistoquímica para BSE a 3 países de la región.

DETALLE DE LAS ACTIVIDADES

1. DIAGNÓSTICO Y CARACTERIZACIÓN SEROEPIDEMIOLÓGICA

A. Diagnóstico

- Se apoyó al SENASAG, Bolivia en el procesamiento de 21 muestras de LEF colectadas en el mes de Abril del corriente año por el Grupo Internacional de Evaluación de Sospecha de FA creado por el Comité Ejecutivo del Proyecto Cuenca del Plata. Todas las muestras resultaron negativas a aislamiento viral por inoculación en tres pasajes consecutivos en cultivos celulares BHK-21 (roller). Asimismo, las referidas muestras también resultaron negativas a la amplificación por PCR tipo-independiente y tipo-específico para O, A y C. Se analizaron también anticuerpos en 27 sueros bovinos y 4 ovinos. En el sistema I-ELISA 3ABC / EITB, los resultados obtenidos con las muestras colectadas, no permitieron inferir actividad viral reciente para el virus de la fiebre aftosa. Las pruebas ELISA-CFL para identificación de anticuerpos estructurales de Fiebre Aftosa (O, A, C) indicaron títulos altos para los tres virus en todos los sueros excepto en dos de los sueros ovinos. En prueba screening ELISA-CFL para identificación de anticuerpos de Estomatitis Vesicular, 27 de los 31 sueros resultaron positivos para el subtipo Indiana, y 2 de ellos positivos para el subtipo New Jersey
- Se apoyó a SENACSA, Paraguay en el procesamiento de las muestras de epitelio y sueros tomadas en el foco de Pozo Hondo, Dpto. Boquerón registrado en el mes de Julio. La amplificación tipo-específica por PCR confirmó el informe del SENCSA, Paraguay sobre la presencia de VFA tipos O y A. La comparación de la secuencia de nucleótidos de la región 3' de la proteína inmunogénica VP1 de la muestra tipo O indicó que la misma es endógena del continente y estrechamente relacionada con los aislamientos responsables de los focos en los departamentos de Chuquisaca y Potosí (Bolivia) en el mismo mes. Asimismo el análisis filogenético indicó que estas muestras comparten un ancestral común con los aislamientos causantes de las emergencias del tipo O en el Cono Sur, entre los años 2000-2002, con los cuales presentan grados de homología de por lo menos 92%. La caracterización genética de la muestra tipo A indicó una estrecha homología con la cepa A24 Cruzeiro. La calidad de la muestra no permitió aislar el virus por pasajes celulares. Complementando estos análisis, se estudiaron 27 sueros (17 bovinos y 10 caprinos). Los resultados del procesamiento de los sueros bovinos en el sistema I-ELISA 3 ABC/EITB sugirió una seroconversión reciente al virus de la

fiebre aftosa, tanto por la alta proporción de sueros positivos (15 de 17), así como por los altos patrones de reactividad observados.

- Se apoyó al SENASAG, Bolivia en el estudio de 8 muestras de epitelio de los focos ocurridos en los Departamentos de Chuquisaca y Potosí, en el mes de Julio. Para el aislamiento viral, se trabajó con 6 muestras de epitelio (5 de origen bovino y 1 de origen porcino), recuperándose virus en 5 muestras (4 bovinos y un porcino). Se realizó la caracterización antigénica de las muestras, las cuales fueron tipificadas como virus O1. Los estudios de cobertura inmunológica de la cepa vacunal O1 Campos Br.1/58, frente a la cepa de campo indicaron EPP superior a 70% para animales primovacunados. La amplificación tipo-específica por PCR confirmó la presencia de VFA tipo O en las 8 muestras estudiadas. La comparación de la secuencia de nucleótidos de la región 3' de la proteína inmunogénica VP1 indicó una homología de por lo menos 99% entre ellos y también con el virus responsable por el foco de Pozo Hondo, Dpto. Boquerón (Paraguay) registrado en el mismo mes, tratándose de la misma variante actuante en todos los episodios. Cuando se compararon con el banco de datos disponible se observó, como fuera mencionado anteriormente, que estos virus son endógenos y comparten un ancestral común con los aislamientos causantes de las emergencias del tipo O en el Cono Sur, entre los años 2000-2002, con los cuales presentaron grados de homología de por lo menos 92%.
- Se apoyó al SASA, Venezuela, en la caracterización genética de 5 muestras de epitelio correspondientes a los focos registrados en el mes de Julio. La amplificación tipo-específica por PCR confirmó la presencia de VFA tipos A (en tres de las muestras) y O (en las otras dos). Fueron efectuados los estudios filogenéticos a partir de la comparación de la secuencia de nucleótidos de la región 3' de la proteína inmunogénica VP1 de las diferentes muestras. Los resultados indican para las muestras tipo O, que las mismas presentan una homología de por lo menos 99% entre ellas. Las mismas son endógenas del continente aunque no fue posible establecer un alto grado de homología con ninguna de las cepas registradas en el banco de datos genéticos. Posiblemente esto se deba a que no contamos con suficientes cepas representativas de los virus que circularon recientemente en la región andina. Para clarificar esta situación PANAFTOSA ha reiterado a los países la importancia de contar con el mayor número posible de muestras representativas de los brotes en la región. Con la cepa vacunal O1/Campos /Bra/58 los aislamientos alcanzan valores de homología de 93%. En el caso de las muestras de tipo A, los datos indican que representan cepas endógenas. Entre dos de ellas se registran valores de homología de 91%; y de aproximadamente 85% entre éstas y la tercera muestra. Con respecto a la cepa vacunal A24/Cruzeiro/Bra/55, los aislamientos presentaron divergencias de 9%, 12% y 14%. Nuevamente, no fue posible establecer un alto grado de homología con ninguna de las cepas de circulación actual, registradas en el banco de datos genéticos.

- Se coordinaron las actividades y se efectuó la transferencia del cepario continental de Fiebre Aftosa a las instalaciones de bioseguridad del laboratorio MERIAL, Brasil.
- Se dio apoyo al ICA, Colombia en el estudio de caracterización antigénica de 36 muestras de suspensiones virales O1 Campos y A24 Cruzeiro elaboradas por los laboratorios de producción de vacuna antiaftosa de ese país.

B. Investigación seroepidemiológica

PANAFTOSA - OPS/OMS ha cooperado en el diseño e interpretación de las investigaciones seroepidemiológicas para monitoreo de actividad viral en la región mediante I-ELISA 3ABC / EITB. Apoyó al LIDIVET, Bolivia, SENASA, Perú, ICA, Colombia, y al DDA, BRASIL en los enfoques de ejecución e interpretación de las encuestas serológicas realizadas en los países, muchas de las cuales fueron o serán presentadas ante la OIE como apoyo al reconocimiento de áreas libres.

2. INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO

Se continuó con el desarrollo, optimización y armonización de métodos que hacen relación a:

- a) evaluación de actividad viral subclínica de fiebre aftosa a partir de la optimización de herramientas para determinación de anticuerpos contra proteínas no capsidales para confirmación, a partir de muestreos adecuadamente diseñados, de ausencia de actividad viral persistente en poblaciones con vacunación sistemática, así como de la implementación de técnicas moleculares (PCR) para detección viral;
- b) rastreo del posible origen de focos de fiebre aftosa mediante caracterización genómica por PCR/secuenciamiento y evaluación de actividad viral subclínica mediante métodos serológicos;
- c) apoyo al diagnóstico emergencial mediante detección rápida del virus de la fiebre aftosa por PCR y diagnóstico diferencial mediante PCR;
- d) diagnóstico diferencial mediante ELISA, PCR, métodos inmunohistoquímicos, así como implementación / optimización de métodos de aislamiento viral;
- e) control de potencia de vacuna
- f) implementación de inmunohistoquímica para BSE.

En este contexto se ha dado seguimiento a una serie de proyectos cooperativos de investigación, los que se describen a continuación junto con los principales avances:

A. Optimización y armonización internacional del sistema I-ELISA 3ABC / EITB en bovinos para detección de infección persistente con el virus de la fiebre aftosa en poblaciones.

En este proyecto cobran importancia las siguientes actividades:

- Se optimizó la capacidad informativa que brinda el sistema mediante el desarrollo de un análisis gráfico por medio de perfiles de reactividad de anticuerpos en el ensayo de I-ELISA 3ABC categorizada en tres niveles de reactividad de negativo y tres de positivo para su uso como indicador epidemiológico de actividad viral. Los resultados fueron publicados en el Archives of Virology, 2003. Este tipo de análisis está siendo actualmente transferido a los países.
- Elaboración de un dossier incluyendo los datos generados de validación del sistema I-ELISA 3ABC / EITB y su actualización según la nueva visión internacional de validación en la que la misma debe enfocarse y adecuarse al objetivo de uso, en este caso para vigilancia epidemiológica. Se incluyeron los valores de desempeño relacionados a: especificidad analítica; especificidad diagnóstica, sin y con vacunación sistemática; especificidad comparativa entre I-ELISA 3ABC y EITB; especificidad comparativa entre I-ELISA 3ABC, EITB e IDAG; sensibilidad analítica; sensibilidad diagnóstica, en condiciones de vacunación o no, en etapas tempranas (hasta 28 días postinfección); sensibilidad diagnóstica, en condiciones de vacunación o no, en etapas correspondientes al establecimiento del estado portador; sensibilidad comparativa, entre ELISA, EITB y Probang; sensibilidad comparativa, entre ELISA, EITB e IDAG; repetibilidad; reproducibilidad. Asimismo fueron incluidos datos de la aplicación a campo, con especial énfasis en áreas con vacunación, particularmente para identificación de áreas con ausencia de actividad viral, y el uso de perfiles de reactividad de I-ELISA 3ABC como indicador epidemiológico de riesgo de actividad viral. Otros aspectos como selección de los sueros cut-off y preparación de los standards de control de calidad interno y el amplio uso en los programas de nuestra región también fueron abordados. Esta información sirvió de apoyo al esfuerzo internacional conjunto coordinado por el grupo ad hoc constituido por la OIE para reconocimiento de este sistema como “index test” para OIE.
- Coordinación de un seminario: “Uso de herramientas seroepidemiológicas y virológicas en la vigilancia de la fiebre aftosa” donde se propiciaron las discusiones sobre la armonización de pruebas para evaluar circulación viral remanente. Las discusiones se focalizaron en los siguientes áreas: uso de kits completos en todos los laboratorios de la región, unificación del formato del sistema diagnóstico, establecimientos de pautas que evalúen la calidad de uso del sistema, incluyendo control de calidad interno y externo, creación de un foro permanente de discusión y la elaboración de enfoques para el establecimiento de paneles unificados para la evaluación de pruebas comerciales.

- En el marco del proyecto regional para operación coordinada de la red de laboratorios de salud animal de América del Sur, y de la IV resolución de la XXX COSALFA, ratificada en la IX COHEFA y 9ª RIMSA, se llevó a cabo en PANAFTOSA - OPS/OMS la primera reunión para evaluación de pruebas laboratoriales. Fue abordada la evaluación del desempeño comparativo de kits disponibles para vigilancia activa de la fiebre aftosa basados en la detección de anticuerpos contra proteínas no capsidales. Participaron 6 laboratorios de 4 países. Durante la reunión fueron establecidos puntos críticos de importancia para la región que incluyó la conformación de un grupo base para dar continuidad a las acciones tendientes a definir pautas para el uso armonizado en la región de kits basados en detección de anticuerpos contra proteínas no capsidales. Los resultados de las pruebas comparativas indican claramente la necesidad de mantener como test de referencia para la región el sistema I-ELISA 3ABC / EITB, y de evaluar nuevos kits antes de su uso, una vez que existen diferencias considerables en el desempeño comparativo de los kits estudiados (UBI, Cedi, Bommeli).
- Participación en la reunión del Grupo Ad Hoc de la OIE para la elaboración de recomendaciones sobre normas y pautas para aplicación de tests para evaluación de anticuerpos contra proteínas no capsidales para apoyo a la vigilancia epidemiológica de la FA, a ser presentado para discusión en la Reunión de la Comisión de Fiebre Aftosa de la OIE. El sistema diagnóstico I-ELISA 3ABC / EITB desarrollado y utilizado por PANAFTOSA - OPS/ OMS fue propuesto como referencia internacional a ser incorporado como index test para la OIE en el manual de standards para tests diagnósticos y vacuna de la OIE del año 2004.
- Se dio continuidad a las actividades para la armonización internacional mediante la conformación de paneles de sueros aptos para realizar pruebas comparativas entre el sistema de PANAFTOSA - OPS/OMS y otros tests disponibles a nivel internacional.
- Se realizaron los estudios preliminares para iniciar la preparación de sueros de referencia internacional incluyendo sueros negativo, positivo y débil positivo. Se estudiaron condiciones de liofilización e inactivación adecuada para la preparación de dichos sueros. Se prepararon diluciones de varios sueros cuyo desempeño está siendo evaluado en laboratorios de referencia en Europa con pruebas disponibles en dichos laboratorios. Los resultados serán la base para la preparación final de los standards de OIE mencionados.
- Se dio continuidad al apoyo en la implantación de las técnicas en cuestión en los laboratorios de los servicios nacionales de Bolivia, Uruguay, Brasil, Perú y Colombia.
- Producción de kits completos de las pruebas que conforman el sistema I-ELISA 3ABC / EITB. En respuesta a la VI recomendación de la XXX COSALFA y para posibilitar un desempeño unificado de los tests para vigilancia activa se desarrolló la infraestructura en PANAFTOSA - OPS/OMS para la entrega de biológicos a los países configurados como kits completos. Esto incluyó una reestructuración interna del laboratorio, incluyendo la contratación de un consultor en servicio,

para permitir cubrir el desarrollo y la sistematización de las distintas etapas que conforman la producción. Las mismas incluyen compra de insumos, producción de antígenos, producción de soportes sólidos (ELISA y EITB), configuración de kits, embalaje y etiquetado, control de calidad de proceso y de producto final, envío de material y asistencia técnica. Asimismo, fueron considerables los avances para conformar el sistema de calidad en lo que se refiere a documentación general y a paneles de sueros como indicadores de la calidad de las diferentes etapas y de producto final.

B. Optimización de procedimientos para evaluación de proteínas no capsidales remanentes en antígenos de vacuna y su impacto en el sistema I-ELISA 3ABC / EITB

Este proyecto, cuenta con la participación de todos los laboratorios productores de Brasil, coordinados a través de la Comisión para Asuntos de Aftosa (CAA), del Sindicato Nacional de Industria de Productos para Salud Animal (SINDAN) de Brasil, y de la Secretaría de Defensa Agropecuaria, Departamento de Defensa Animal del Ministerio de Agricultura, Pecuaria y Abastecimiento, Brasil. El mismo permitirá profundizar y ampliar el desarrollo de procedimientos para la evaluación de potenciales interferencias en las pruebas de I-ELISA 3ABC / EITB inducidas por proteínas no capsidales eventualmente presentes en las suspensiones virales a ser utilizadas en vacunas antiaftosa. Asimismo viabilizará enfoques para la toma oportuna de decisiones durante el propio proceso de producción para evitar las interferencias mencionadas.

La primera fase del proyecto, ejecutada durante el año 2002, permitió establecer ensayos competitivos de I-ELISA 3ABC y de EITB para evaluar proteínas no capsidales en las suspensiones virales destinadas a vacuna e inferir procedimientos que, en principio, no induzcan anticuerpos contra las mencionadas proteínas.

La segunda etapa, ejecutada durante este año, tuvo como objetivo principal correlacionar la presencia de proteínas no capsidales en suspensiones virales seleccionadas como futuros padrones para cada laboratorio y la inducción de anticuerpos en condiciones normales y forzadas de vacunación. Fueron evaluadas:

- La presencia de PNC en 40 suspensiones virales inactivadas provenientes de 4 laboratorios productores de Brasil;
- Las reactividades en el sistema I-ELISA 3ABC / EITB en sueros de animales vacunados y revacunados. Se estudiaron 5693 sueros provenientes de animales previo y a 28 días luego de inmunizados y revacunados según condiciones de vacunación sistemática a campo y de esquemas forzados de vacunación (3 revacunaciones a intervalos de 30 días) con 5 vacunas comerciales, provenientes de los diferentes laboratorios productores. Fueron evaluados 40 lotes diferentes de vacuna

A partir de los resultados de los modelos mencionados las principales conclusiones fueron:

- 1) El análisis de los sueros de animales revacunados en condiciones forzadas a 28 días de la vacunación/revacunación constituye un excelente indicador del grado de pureza de las suspensiones virales en lo que se refiere a la presencia de proteínas no capsidales remanentes y el efecto de otros componentes en la respuesta. Sin embargo, los resultados deben ser evaluados con precaución por desconocerse el real significado de los mismos al nivel de muestreos para la vigilancia.
- 2) Los tests de I-ELISA y de EITB competitivos son excelentes indicadores de concentración de proteínas no capsidales en suspensiones virales destinadas a la preparación de vacunas. Fue establecido que niveles equivalentes de PNC residual pueden inducir diferentes niveles de respuesta de anticuerpos según la formulación de las vacunas. Cada laboratorio productor deberá validar el valor de corte (concentración de proteína no capsidal a partir de la cual se observa la inducción de anticuerpos en bovinos), apropiado para su formulación de vacuna, estudio que se priorizará durante el próximo año.

Sobre la base de los resultados descriptos, se elaborará una tercera fase del proyecto para dar continuidad a estos estudios, incluyendo la evaluación de la concentración de proteína no capsidal durante las distintas etapas del proceso de producción, a fin de definir los puntos críticos, establecimiento de punto de corte para cada laboratorio, etc., evaluación de panel de monoclonales para cuantificar VP1 intacta, etc.

C. Optimización/aplicación del sistema I-ELISA 3ABC / EITB para su uso en ovinos, caprinos, porcinos, bubalinos y camélidos.

Se cuenta con una colección satisfactoria de sueros para dar inicio a la validación del sistema en otras especies diferentes al bovino.

D. Optimización y aplicación de métodos en apoyo a estudios de epidemiología molecular de FA.

Este proyecto se realiza en colaboración con el Instituto de Microbiología Prof. Paulo de Góes (IMPPG) de la Universidad Federal de Rio de Janeiro (UFRJ), Río de Janeiro, Brasil y la Unidad de Enterovirus de la Fundación Oswaldo Cruz y los principales logros hacen relación con:

- Fueron caracterizadas genéticamente 8 cepas correspondientes a virus de tipo A y O circulantes en Bolivia entre los años 2000 y 2002. Los datos obtenidos fueron de gran importancia para las interpretaciones filogenéticas en la región.

- Se estableció un proyecto cooperativo con el ICA, Colombia para el estudio de cepas históricas de dicho país. En el marco de este proyecto se han caracterizado genéticamente 10 cepas.
- Se completó un estudio acerca de la adaptación genética de virus durante pasajes en célula y su incidencia en las interpretaciones de los estudios filogenéticos de VFA. Los resultados fueron resumidos en una monografía presentada en la Universidad Federal de Río de Janeiro.
- Se continuaron los estudios acerca de las variaciones genéticas observadas en aislamientos consecutivos de VFA obtenidos de 6 búfalos persistentemente infectados, a partir del análisis mediante mapas bidimensionales de oligonucleótidos resistentes a RNasa T1 del genoma viral completo y de las secuencias genéticas de la región que codifica para la proteína inmunogénica VP1.

E. Optimización de métodos de PCR para detección viral durante diagnóstico emergencial y en infección subclínica.

Se implementaron las técnicas de PCR tipo independiente (usando iniciadores universales para los tres serotipos, localizados en el gen de 3D), y tipo específica para infección aguda utilizando como modelo las cepas de referencia de Sudamérica. Fueron amplificadas 107 cepas adaptadas a célula y 92 de material de epitelio mediante PCR tipo independiente, y, tipo específica, 60, 25 y 11 cepas A, O y C respectivamente adaptadas a célula y 62 tipo A y 57 tipo O de muestras de material de epitelio. Fue posible la amplificación tipo específica y caracterización genética tipo O de cuatro muestras que habían resultado negativas por aislamiento viral en cultivo de células. La validación final de este enfoque incluyendo la detección de infección subclínica depende de modelos de campo. Se ha elaborado un proyecto regional multicéntrico para cubrir dicha necesidad, cuya propuesta fue distribuida a los Servicios Nacionales de los Países de la región.

F. Desarrollo y adaptación de métodos para la detección de antígenos de enfermedades incluidas en el diagnóstico diferencial de fiebre aftosa.

Se puso a punto el método de PCR para detección de los virus de Lengua Azul y Diarrea Viral Bovina luego de su pasaje en cultivo de tejidos/células.

G. Se dio continuidad a la implementación en los países de enfoques de diagnóstico para detección de encefalopatías espongiiformes

Se implantó la técnica de inmunohistoquímica en tejidos fijados en formalina e inactivados en ácido fórmico en Perú, Paraguay y Cuba.

H. Desarrollo y adaptación de métodos par la detección de antígenos de enfermedades vesiculares.

- En base a resultados preliminares obtenidos por el laboratorio de Estomatitis Vesicular de Plum Island/ARS/USDA, fueron seleccionados iniciadores y estudiados frente a las cepas Indiana-2 e Indiana-3 del cepario de PANAFTOSA - OPS/OMS.
- Se iniciaron estudios de sensibilidad de método diagnóstico por fijación de complemento 50% utilizando solución Salina-Borato. Se comenzaron las pruebas para validación del mismo en colaboración con el laboratorio LAPA/Belém. Los resultados preliminares sugieren que el uso de Salina-Borato en sustitución del Tampón Barbital, no comprometería la sensibilidad del método diagnóstico.

I. Desarrollo y adaptación de métodos par la detección de anticuerpos de enfermedades vesiculares.

Se iniciaron los estudios para padronización de la metodología de ELISA-CFS para estudiar anticuerpos de fiebre aftosa O1 Campos.

J. Desarrollo y optimización de métodos para control de vacuna

En esta materia se destacan las siguientes actividades:

- Se continuaron los estudios, para evaluar los efectos de la inclusión del inmunoestimulante saponina en vacunas antiaftosa, sobre las pruebas de control de virus activo residual. Las diferentes vacunas fueron sometidas a proceso de quiebra de emulsión por tratamiento con cloroformo y centrifugación. Se adaptó para uso con vacunas oleosas, el protocolo de elución de antígeno de vacunas con hidróxido de aluminio. Una fracción de cada eluido de vacunas oleosas (emulsión simple agua en aceite) conteniendo saponina en las siguientes concentraciones (expresada en mg/ml de fase acuosa): 0; 1; 1,5; 2; 3 fue tratado con 10% de PEG 6000 y centrifugado. El sobrenadante fue separado para estudio y el pellet resuspendido en MEM. Los resultados preliminares indican que el pellet resuspendido carece de actividad hemolítica y citotóxica y en el mismo fue confirmada la presencia del antígeno, sugiriendo que el método es adecuado para identificar los antígenos incluidos en las vacunas experimentales estudiadas. Además, en los experimentos de inoculación *in vitro* no se observó interferencia con la viabilidad de los substratos celulares utilizados en pruebas de citotoxicidad.
- Para permitir la detección de saponina en vacunas oleosas fue adoptada la metodología *in vitro* de determinación de actividad hemolítica descrita por Liu et al. (2002), con algunas modificaciones para ser usada tanto en tubos como en microplacas. La metodología utilizada

permite detectar propiedades hemolíticas en las vacunas experimentales que contienen saponina. El estudio se continuará mediante articulación de colaboraciones con laboratorios nacionales para ampliar el mismo con el análisis de vacunas comerciales.

- Fue realizada durante el período, la etapa de laboratorio correspondiente al estudio preliminar para evaluar el efecto de la administración del antiparasitario ivermectina en la respuesta inmune de animales vacunados con vacuna antiaftosa. Se utilizaron 10 ovinos. Las muestras de suero colectadas fueron estudiadas por ELISA-CFL para determinar el nivel de anticuerpos. Los resultados obtenidos sugieren que el tratamiento con el antiparasitario podría resultar en respuestas diferentes según el sexo de los animales. En base a este experimento piloto, se propuso un estudio en bovinos con mayor número de observaciones.
- Atendiendo a las recomendaciones del VII Seminario Internacional de Vacuna Antiaftosa, fue preparada la base de datos de profesionales propuestos por sus respectivos países para formar Comités de evaluación para Acreditación de Sistemas Nacionales Oficiales para el Control de Calidad de Vacuna Antiaftosa.

3. SISTEMAS DE CALIDAD DE SERVICIOS

A. Definición de normas y pautas

- Se brindó consultoría en los esfuerzos coordinados por OIE conjuntamente con IAEA y FAO para la elaboración de “Guías de OIE para validación y certificación de ensayos de diagnóstico para enfermedades infecciones animales” .

B. Implementación

- Se ha sistematizado el enfoque establecido para la elaboración de los Procedimientos Operacionales Padrón. Se han redactado, aprobado y colocado en vigencia 9 procedimientos operacionales padrón, siguiendo normas de calidad internacional, vigentes a partir del 28 de Julio, 2003, relacionados a gestión interna de muestras, registro de análisis y ensayos, certificación, verificación y uso de instrumentos de medición y ensayo, y uso de equipos de frío. Se determinaron los requerimientos para una infraestructura laboratorial compatible con la implementación de políticas de calidad y se certificaron los instrumentos de medida (balanzas, pesos padrones, micropipetas, termómetros, etc.) y de cabinas de seguridad biológico. A continuación se detallan los POPs vigentes:
 - Control de equipo e instrumentos de medición y ensayo (POP CA-005-01)

- Rotulación de soluciones y reactivos (POP CA-006-01)
- Uso de heladeras y cámaras de + 4°C (POP CA-008-01)
- Uso de ultra congeladoras (POP CA-009-01)
- Uso de termos contenedores de nitrógeno líquido (POP CA)-010-01
- Uso de congeladores (POP CA-011-01)
- Uso de baños termostáticos (POP CA-012-01)
- Uso de cabinas de seguridad biológica (POP CA-013-01)
- Gestión interna de muestras para análisis o ensayo (POP EM-001-01)
- Cómo escribir, formatear, manejar y administrar Procedimientos Operativos Patrón (POP CA-001-01)
- Redacción de procedimientos técnicos, métodos analíticos e instrucciones de trabajo (POP CA-004-01)
- Identificación de equipos, instrumentos y patrones (POP CA-002-01)
- Verificación de balanzas (POP CA-003-01)

4. EVENTOS INTERNACIONALES

Se participó y/o promovió el desarrollo de los siguientes eventos:

- Participación en la reunión técnica sobre “Prevención y Control de EEB” coordinada por la oficina regional de OIE, Santiago, Chile, 04-05 de Febrero.
- Participación en la IX Reunión de la Subcomisión para Fiebre Aftosa de la OIE del Sudeste Asiático, Yogyakarta, Indonesia, 03-07 de Marzo.
- Seminario Internacional Pre COSALFA sobre “Uso de Herramientas Seroepidemiológicas y Viroológicas en la Vigilancia Activa de Fiebre Aftosa”, Santiago, Chile, 10-11 de Marzo.

Presentaciones:

- a) “Instrumentos Diagnósticos para la Vigilancia de la Fiebre Aftosa”
 - b) “Pruebas Serológicas y Viroológicas en la Vigilancia Activa de la Fiebre Aftosa”
 - c) “Epidemiología Molecular en la Vigilancia”
- Participación en XXX COSALFA, Santiago, Chile, 13-14 de Marzo.
 - Participación en COHEFA, RIMSA, Washington DC, 22-26 de Abril.
 - Participación en el curso sobre Técnicas de Diagnóstico para EEB, organizado por FAO, Berna, Suiza, 07-11 de Julio.

- Participación en el “IX Seminario sobre Armonización del control de Medicamentos Veterinarios” , Buenos Aires, Argentina, 11-14 de Agosto.
- Participación en Reunión del Comité Veterinario Permanente-Cuenca del Plata, Buenos Aires, Argentina, 27-29 de Agosto.
- Participación en el XI Congreso Latinoamericano de Buiatría, Salvador, Bahía, 02-05 de Septiembre.
Presentación: “Importancia de los Nuevos Enfoques de Diagnóstico en el Control y Erradicación de la Fiebre Aftosa”
- Participación en el Seminário Internacional de Calidad en Laboratorios., São Paulo, Brasil, 21-24 de Septiembre.
- Organización y realización en PANAFTOSA - OPS/OMS el Curso Internacional de Técnicas en Biología Molecular, Río de Janeiro, Brasil, 08-12 de Septiembre.
- Participación en el Grupo ad hoc OIE sobre definición de normas para uso e interpretación de pruebas que utilizan proteínas no capsidales, Paris, Francia, 17-19 de Octubre.
- Participación en XXX COMBRAVET, Manaus, Brasil, 06-08 de Octubre.
Presentación: “Uso de herramientas seroepidemiológicas y virológicas en la vigilancia de fiebre aftosa”.
- Participación en Simposio Internacional sobre aplicación de técnicas genéticas para mejoramiento de la producción animal y para la salud en los países en desarrollo, organizado por la IAEA/FAO, Viena, Austria, 06-10 de Octubre.
Presentación: “Evaluation of Diagnostic Tools for Epidemiological Purposes. Application to Foot-and-Mouth Disease”.
- Organización en PANAFTOSA - OPS/OMS de la Primera Reunión para Evaluación de Pruebas Laboratoriales. Evaluación del desempeño comparativo de kits disponibles para vigilancia activa de la fiebre aftosa basados en la detección de anticuerpos contra proteínas no capsidales. Río de Janeiro, Brasil, 04-07 de Noviembre.
Presentaciones:
 - a) Criterios epidemiológicos sobre el uso de herramientas serológicas para detección de infección.
 - b) Importancia del uso de kits diagnósticos para vigilancia activa de fiebre aftosa.
 - c) Desempeño comparativo de kits que usan proteínas no capsidales para vigilancia activa de la fiebre aftosa.

- d) Definición de colecciones apropiadas de sueros para la evaluación comparativa de pruebas serológicas
- Participación en el 10º Simposio Internacional de Epidemiología y Economía Veterinaria. Viña del Mar, Chile 17-21 de Noviembre.

Presentaciones:

- a) Epidemiología molecular del virus de la fiebre aftosa en América del Sur
- b) Uso de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) para el diagnóstico emergencial del virus de la fiebre aftosa
- c) Vacunación y ensayos diagnósticos para la vigilancia activa de la fiebre aftosa
- d) Detección y significado de actividad viral persistente de fiebre aftosa evaluada bajo condiciones experimentales y de campo
- Participación en el curso sobre técnicas de diagnóstico para Encefalopatía Espongiforme Bovina, organizado por el laboratorio veterinario Weybridge, Reino Unido. Woking, Reino Unido 24-28 de Noviembre.
- Participación en la II Reunión de la Comisión Permanente de las Américas para las EET de los Animales, Buenos Aires, Argentina 01-05 de Diciembre.
- Participación, como miembro del grupo consultivo, en la 2^{da} reunión de consultores de OIE-FAO/IAEA relacionada a "Guías de OIE para validación y certificación de ensayos de diagnóstico para enfermedades infecciones animales". Viena, Austria 09-12 de Diciembre.

5. CAPACITACIONES y DISCUSIONES TÉCNICAS

A. Cursos

- Curso de diagnóstico molecular y epidemiología molecular del virus de la fiebre aftosa.
8-12 Septiembre 2003
Se contó con la participación de 15 profesionales de los Servicios Nacionales de 11 países de la región
Curso teórico práctico. Tópicos abordados:
Introducción al curso
Importancia de las técnicas moleculares en el diagnóstico de la fiebre aftosa
Extracción y manipulación de RNA
Síntesis de DNA complementario (cDNA)
Amplificación con iniciadores específicos por PCR
Secuenciamiento del virus de la fiebre aftosa:

Lectura de las reacciones en Secuenciador Automático ABI Prism 310
Análisis computacional
Construcción de árboles filogenéticos

B. Entrenamientos individuales en PANAFTOSA - OPS/OMS

- Dr. Daniel Ardaya Vaca – SENASAG, LIDIVET Bolivia

- Dr. José Luis Quiroga - SENASAG, LIDIVET Bolivia
20 Enero-31 Marzo
Biología Molecular (RT-PCR y secuenciamiento)
Pruebas de ELISA 3ABC y EITB
ELISA CFL para diferenciales
Técnicas de cultivo celular

- Dr. Daniel Ardaya Vaca – SENASAG, LIDIVET Bolivia
21-30 de Abril
Técnicas de aislamiento viral a partir de LEF.

- Dra Meirivan da Silva Barbosa- LAPA-Belem
25 de Agosto-12 de Septiembre
Técnicas de diagnóstico diferencial

- Dr. Camilo Sánchez ICA, Colombia
15-26 Septiembre
Biología Molecular (RT-PCR y secuenciamiento)

C. Programas de postgrado

- Orientación de tesis de doctorado del MS José Junior de França Barros. Universidad Federal de Río de Janeiro
- Orientación de monografía de graduación de la Srta. Thais Gama de Oliveira. Universidad Federal de Río de Janeiro

D. Visitas a PANAFTOSA - OPS/OMS para discusiones técnicas

Dra. Mariluz Villamil-LANIP, Colombia

Dra. Claudia Aguirre-VECOL, Colombia

8-12 de Diciembre

Discusiones técnicas sobre prueba de ELISA-CFL para control de vacuna

E. Consultorías a países

Uruguay, DILAVE. 08-09 de Mayo

Uso e interpretación de pruebas para detección de anticuerpos contra proteínas no capsidales.

Paraguay, SENACSA. 12-14 de Febrero; 02-04 Agosto

Interpretación de pruebas para detección de anticuerpos contra proteínas no capsidales.

Brasil, CLA/DDA. 27-29 de Agosto

Protocolo de inmunohistoquímica para BSE a ser adoptado por Brasil

Perú, SENASA. 21-29 de Septiembre

Implementación de la técnica de inmunohistoquímica para BSE

Paraguay, SENACSA. 29 de Septiembre-04 de Octubre

Implementación de la técnica de inmunohistoquímica para PrPsc y su uso en la vigilancia epidemiológica de encefalopatía espongiforme en Paraguay

Colombia, ICA/LANIP. 13-20 de Octubre

Implementación de la técnica de ELISA-CFL para control de potencia de vacuna.

Paraguay. LAUDA 10-15 de Diciembre

Técnicas de cultivo celular para producción de biológicos y diagnóstico

Cuba, Instituto de Medicina Veterinaria 06-14 de Diciembre

Implementación de la técnica de inmunohistoquímica para BSE

6. DIFUSIÓN DE INFORMACIÓN

1. Allende R, Mendes AJ, Comparsi Darsie G. South American standards for foot-and-mouth disease vaccine quality. In: Dodet B, Vicari M (eds). Foot-and-mouth disease: control strategies. Paris: Editions scientifiques et médicales Elsevier SAS; 2003. pp. 331-336
2. Bergmann IE. Instrumentos diagnósticos para la vigilancia de la fiebre aftosa. In: Actas Seminario Internacional sobre Uso de Instrumentos Seroepidemiológicos y Viroológicos en la Vigilancia Activa de Fiebre Aftosa, Santiago, Chile, 10-11 marzo 2003. pp.17-22
3. Bergmann IE. El Papel de los Laboratorios de Referencia en los Programas de Sanidad Animal en América del Sur. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz 22 (2), 537-545, 2003.
4. Bergmann IE, Correa Melo E. Impacto do diagnóstico sorológico da febre aftosa. DBO Saúde Animal 2003; outubro: 38-39. Numero especial.
5. Bergmann IE. Fiebre Aftosa: Herramientas Seroepidemiológicas (I-ELISA 3ABC / EITB) en la Vigilancia Activa de la Fiebre Aftosa. CD ROM. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa OPS/OMS; 2003.
6. Bergmann IE. Documents in support of the Validation of the I-ELISA 3ABC / EITB System for use in Foot-and Mouth Disease Surveillance. CD Card. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa OPS/OMS; 2003.
7. Bergmann IE, Malirat V & Neitzert E. Pruebas serológicas y virológicas en la vigilancia activa de la fiebre aftosa. En: Actas Seminario Internacional sobre Uso de Instrumentos Seroepidemiológicos y Viroológicos en la Vigilancia Activa de Fiebre Aftosa, Santiago, Chile, 10-11 marzo 2003. pp. 10-15
8. Bergmann IE, Malirat V, Neitzert E, Correa Melo E. Validation of the I-ELISA 3ABC / EITB System for Use in Foot-and Mouth Disease Surveillance: Overview of the South American Experience. In: Dodet B, Vicari M (eds). Foot-and-mouth disease: control strategies. Paris: Editions scientifiques et médicales Elsevier SAS; 2003. pp. 361-370
9. Bergmann IE, Malirat V, Neitzert E, Correa Melo E. Vaccines and Companion Diagnostic Tests for Foot-and-Mouth Disease Virus. An overview of the Experience in South America. Dev Biol 2003; 114: 59-65
10. Bergmann IE, Malirat V, Neitzert e, Correa Melo e. Evaluation of diagnostic tools for epidemiological purposes. Application to FMD. In: selected papers of the international symposium on gene-based technologies for improving animal production and health in developing countries. Viena, Austria, 06-10 october 2003. En prensa.
11. Bergmann IE, Neitzert E, Malirat V, Correa Melo E. Detección y significado de actividad viral persistente evaluada bajo condiciones experimentales y de campo. In: Actas del 10º Simposio Internacional de Epidemiología y Economía Veterinaria, ISVEE 10; 2003.
12. Bergmann IE, Neitzert E, Malirat V. Vacunación y ensayos diagnósticos para la vigilancia activa de la fiebre aftosa. In: Actas del 10º Simposio Internacional de Epidemiología y Economía Veterinaria, ISVEE 10; 2003.
13. Bergmann IE, Neitzert N, Malirat V, Ortiz S, Colling A, Sánchez C, Correa Melo E. Rapid Serological Profiling by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and its Use as an Epidemiological Indicator of Foot-and-Mouth Disease Viral Activity. Arch Virol 2003; 148: 891-901
14. Clavijo A, Viera-Pereira PJ, Bergmann IE. Use of the Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) for the Rapid Diagnosis of Foot-and-Mouth Disease in South America. Vet Res Comm 2003; 27: 63-71
15. Malirat V, Bergmann IE. Epidemiología Molecular en la Vigilancia. In: Actas Seminario Internacional sobre Uso de Instrumentos Seroepidemiológicos y Viroológicos en la Vigilancia Activa de Fiebre Aftosa, Santiago, Chile, 10-11 marzo 2003. pp. 23-26

16. Malirat V, Bergmann IE. Uso de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) para el diagnóstico emergencial del virus de la fiebre aftosa. In: Actas del 10º Simposio Internacional de Epidemiología y Economía Veterinaria, ISVEE 10; 2003.
17. Malirat V, Costa Veiga E, Bergmann IE. Epidemiología molecular del virus de la fiebre aftosa en América del Sur. In: Actas del 10º Simposio Internacional de Epidemiología y Economía Veterinaria, ISVEE 10; 2003.

7. SUMINISTRO DE INSUMOS

El laboratorio de PANAFTOSA - OPS/OMS prestó asistencia técnica a los países en el suministro y control de calidad de insumos de laboratorio, para actividades de diagnóstico e investigaciones relacionadas a la vigilancia epidemiológica de la fiebre aftosa y otras enfermedades confundibles. En lo que hace relación a la necesidad de contar con kits completos para la vigilancia activa, según resolución VI de XXIX COSALFA, y a partir de los problemas logísticos constatados con la empresa EMBRABIO con la cual se había establecido un convenio para la producción de dichos kits, PANAFTOSA - OPS/OMS en el marco de la resolución VI de la XXX COSALFA, ratificada en la IX COHEFA reorientó las actividades hacia la implementación de una unidad de producción de kits completos que garantizó el suministro adecuado a los países. Dicha implementación consolidada en un período de solo dos meses, permitió garantizar el suministro regular de los kits con garantía de calidad. En la siguientes tablas se resumen los biológicos (A) o kits completos (B) entregados a los diferentes países para la ejecución de las pruebas correspondientes.

A. Sets de biológicos para el número de pruebas indicado a seguir

PAÍS Pruebas	Arg.	Bol.	Brasil	Chile	Col.	Ecu.	Parag.	Perú	Uru.	Venez.	TOTAL
Tipificación ELISA-SI		700	1.400				2.450	700		700	5.950
Subtipificación FC			3.750			8.750					12.500
ELISA CFL Seroepidem.			6.000	21.000	12.000		9.000	3.000		2.000	53.000
ELISA CFL Control Vacuna			166.000		28.000		9.000			8.000	211.000
ELISA CFL VSV		2.000	7.000	2.000			8.000			6.000	25.000
3D-IDGA		1.000	11.500	14.000			21.000	2.000			49.500
VIAA-ELISA			1.000	5.000							6.000
ELISA Lengua Azul		1.000	3.000					1.000			5.000
IDGA Lengua Azul	3.000		3.000				2.000	1.000			9.000
ELISA IBR			1.000				4.000	1.000			6.000

B. Kits completos para el número de pruebas indicado a seguir

PAÍS Pruebas	Arg.	Bol.	Brasil	Chile	Col.	Ecu.	Parag.	Perú	Uru.	Venez.	TOTAL
I-ELISA 3ABC		4.400	92.240		35.200	1.760	1.760	14.960			150.320
EITB	1.160	400	13.000		12.218	400	3.000	2.792			32.970

Asimismo, han sido producidas y distribuidas líneas de células BHK, MDBK, PK15 y VERO para diagnóstico de referencia y producción de inmunobiológicos a Bolivia, Brasil y Paraguay, y se ha coordinado el suministro a Colombia y Venezuela de cepas virales serotipo O1 Campos y A24 Cruzeiro producidos por el LARA/RS, M.A.P.A./ Brasil para uso en producción de vacuna.



**Organización
Panamericana
de la Salud**

Oficina Regional de la
Organización Mundial de la Salud