

II TALLER INTERNACIONAL DE DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE FIEBRE AFTOSA



INFORME FINAL

Asunción, Paraguay | 8 a 12 de mayo de 2017



PANAFTOSA
Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
Salud Pública Veterinaria

**INFORME FINAL
II TALLER INTERNACIONAL DE
DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE FIEBRE AFTOSA**

Asunción, Paraguay / 8 a 12 de mayo de 2017

CONTENIDO

1. Antecedentes	3
2. Objetivo	4
3. Metodología	4
4. Agenda	4
5. Conclusiones y recomendaciones (versión inglés y portugués).....	4
Anexos	11

Anexo I: agenda

Anexo II: lista de participantes

Anexo III: Presentaciones

1. ANTECEDENTES

Los países de las Américas han acordado establecer y ejecutar acciones a nivel de sus programas nacionales para la eliminación de fiebre aftosa del continente, y se han dado como marco el Plan Hemisférico de Erradicación de Fiebre Aftosa - PHEFA. Dos planes de acción han sido elaborados, el primero ejecutado entre el 1988 – 2009, y el segundo actualmente en ejecución del 2011 al 2020. La meta es llegar al 2020 con todos los territorios de Américas sin circulación viral en todas las poblaciones susceptibles, con evidencias comprobadas con base en las normativas de reconocimiento internacional de zonas y países libres. Se tiene como meta proteger y preservar todas las poblaciones animales que tienen la condición de libre sin vacunación, y paralelamente ir suspendiendo progresivamente la vacunación sistemática en aquellas poblaciones que presenten condiciones favorables de viabilidad, con base en estudios de riesgo nacionales y regionales y a esquemas de prevención sostenibles financiera y operativamente.

Importantes avances se han obtenido a través de la ejecución del PHEFA. Se ha preservado la condición de libre sin vacunación (aproximadamente 170 millones de bovinos) de las Regiones de Norte América, Meso América y Caribe; en países como Chile, Guyana, Guyana Francesa, Surinam y territorios de Argentina, Brasil, Colombia y Perú, habiéndose agregado en los últimos años a este grupo territorios de Argentina y Bolivia. Asimismo, se ha logrado obtener cerca del 85% de las poblaciones de Sudamérica (300 millones de bovinos aproximadamente) en condiciones de libres con vacunación, fundamentalmente gracias a la ejecución efectiva de campañas sistemáticas y obligatorias de vacunación, asistidas por el control de movimiento de ganado y por la adecuación de los métodos de diagnóstico a los avances en el control y erradicación de la Fiebre Aftosa.

Por otro lado, se han obtenido drásticas reducciones de la incidencia de casos clínicos de fiebre aftosa en Sudamérica, teniendo territorios donde hace más de 15 años no se reportan episodios clínicos de la enfermedad, llegando hoy día a tener en forma inédita un lapso de tiempo de más de cuatro años sin reportes de detección de episodios clínicos de la enfermedad en toda Sudamérica.

En atención al ítem 8.5 del Plan 2011 – 2020 del PHEFA, los laboratorios de diagnóstico de la región en forma dinámica deben adecuar el algoritmo de diagnóstico a los diferentes escenarios epidemiológicos de las enfermedades confundibles con fiebre aftosa, de manera a aumentar la sensibilidad de atención a casos de sospechas de ocurrencia de enfermedad vesicular.

Con anterioridad a este Taller, en el año 2002, se realizó el primer Taller Internacional sobre armonización de técnicas de diagnóstico diferencial (Duque de Caxias, RJ-Brasil), con el objetivo de colaborar con los países para fortalecer el diagnóstico frente a enfermedades confundibles con fiebre aftosa.

Considerando que en los últimos años hubo grandes avances en las metodologías de diagnóstico, principalmente en el área molecular y los servicios de campo aumentaron la sensibilidad para detección de casos con sintomatología confundible con enfermedad vesicular, se organiza este II Taller Internacional de Diagnóstico Diferencial de Fiebre Aftosa para presentar la experiencia en el diagnóstico de enfermedades prioritarias confundibles con fiebre aftosa, y discutir la necesidad de implantar en los laboratorios de los países del PHEFA, metodologías para su diagnóstico.

El Taller se realiza en el periodo 8 a 12 de mayo de 2017, en la ciudad de Asunción, Paraguay en el ámbito del Acuerdo de Cooperación Técnica entre el Servicio Nacional de Calidad y Salud Animal – SENACSA de Paraguay y la Organización Panamericana de la Salud a través del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa - PANAFTOSA-OPS/OMS.

2. OBJETIVO

Crear un foro de discusión entre los especialistas de diagnóstico de vesiculares de la región para fortalecer el diagnóstico de enfermedades confundibles con fiebre aftosa en el contexto del PHEFA.

3. METODOLOGÍA

Se realizaron presentaciones orales sobre la experiencia de especialistas de laboratorio de la región, en el diagnóstico de patologías incluidas en la agenda, confundibles con enfermedad vesicular.

Cada sesión de presentaciones fue seguida de una discusión en plenario y contó con moderadores que condujeron la discusión y colocaron la visión descrita en el Manual Terrestre de OIE sobre el patógeno en discusión. Finalmente se realizó una sesión de trabajos de grupo para elaborar recomendaciones sobre los diferentes temas abordados.

Al final del evento, se entregó a los participantes, un dispositivo electrónico con copia de todas las presentaciones realizadas en el Taller.

4. AGENDA

La agenda de trabajo se encuentra en el Anexo 1 y en el Anexo 2 se encuentra la lista de participantes que asistieron al evento. Copias de las presentaciones realizadas se encuentran en el Anexo 3.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

De los temas debatidos durante el II Taller Internacional de Diagnóstico Diferencial de Fiebre Aftosa se concluye que el diagnóstico diferencial de fiebre aftosa debe adecuarse a los avances en la erradicación de la enfermedad y en consecuencia aumentar la sensibilidad para el diagnóstico de otras patologías confundibles con fiebre aftosa. Se concluye que:

- La capacidad de realizar diagnóstico de enfermedades incluidas en el diagnóstico diferencial de vesiculares es heterogénea entre los laboratorios de apoyo al PHEFA;
- Existe la necesidad de mantener contactos periódicos entre los especialistas de diagnóstico de vesiculares de la región, para actualización de informaciones y experiencias técnicas;
- Actualmente PANAFTOA provee materiales de referencia para PCR de fiebre aftosa, estomatitis vesicular, IBR, BVD y lengua azul. Se evidenció la necesidad de identificar proveedores de materiales de referencia para otros patógenos causantes de enfermedades confundibles con vesicular;
- Se identificó la necesidad de actualizar y armonizar la lista de patógenos incluidos en el diagnóstico diferencial así como los procedimientos para el diagnóstico de enfermedades confundibles con vesiculares, y adecuar el algoritmo de diagnóstico diferencial de fiebre aftosa al escenario actual de enfermedades confundibles en la región;
- Los participantes manifestaron interés en que PANAFTOA organice ejercicios de interlaboratorio para enfermedades incluidas en el diferencial de fiebre aftosa;
- Los participantes manifestaron interés en que PANAFTOA retome la entrega de los sets ELISA-CFL para anticuerpos de estomatitis vesicular New Jersey, Indiana-1 (Indiana) e Indiana-3 (Alagoas) y ante el ofrecimiento de APHIS de testar el kit producido en Plum Island para identificación de anticuerpos para Estomatitis Vesicular, se manifestaron positivamente;

- El algoritmo de gestión de riesgo biológico descrito en el Manual Terrestre de OIE provee la base para definir las condiciones necesarias para actividades con los diferentes patógenos en los laboratorios de diagnóstico veterinario;
- Se debe asegurar que en el proceso de atención a sospechas de enfermedad vesicular se registre información necesaria para un correcto diagnóstico diferencial;
- Se debe promover la capacitación del veterinario de campo en toma y envío de muestras para el diagnóstico de enfermedades confundibles con vesiculares.

Con base en estas conclusiones se recomienda:

1. Que los países de la región fortalezcan las actividades de diagnóstico diferencial de fiebre aftosa y estimulen a nivel de campo la toma de muestras para los diferentes patógenos así como las condiciones de envío adecuadas para su preservación;
2. Que los laboratorios de apoyo al PHEFA, se aseguren de que sean implantadas en el país, las pruebas de diagnóstico virológico para diferencial de fiebre aftosa, considerando como mínimo los siguientes patógenos:
 - Estomatitis Vesicular New Jersey, Indiana, Cocal y Alagoas
 - Senecavirus
 - Orthopoxvirus
 - Parapoxvirus
 - Lengua Azul
 - Fiebre Catarral Maligna
 - Diarrea Viral Bovina
 - Rinotraqueítis Infectiosa Bovina;
3. Que PANAFTOA estudie la manera de reanudar la realización de reuniones anuales de especialistas de laboratorio de vesiculares y proponga un mecanismo para reactivarlas;
4. Que PANAFTOA realice esfuerzos para retomar la entrega de sets ELISA-CFL para identificación y titulación de anticuerpos para estomatitis vesicular New Jersey, Indiana y Alagoas e informe a los países y a la 45 COSALFA sobre las perspectivas a mediano plazo;
5. Que el Laboratorio de Referencia de PANAFTOA identifique potenciales proveedores de materiales de referencia para pruebas moleculares y serológicas de Poxvirus (Ortho y Para), Fiebre Catarral Maligna y Senecavirus, y viabilice la disponibilidad de los mismos, de manera armonizada para uso en los laboratorios de diagnóstico de vesiculares de apoyo al PHEFA;
6. Que el Laboratorio de Referencia de PANAFTOA estudie la posibilidad de incluir ejercicios interlaboratorio para enfermedades confundibles, dentro de su portafolio de ejercicios interlaboratorio, y comunique su parecer a la 45 COSALFA;
7. Que los representantes de los laboratorios participantes de este II Taller Internacional, informen a PANAFTOA el tipo y cantidad de sueros (con información epidemiológica de respaldo) que están en condiciones de disponibilizar para contribuir a la evaluación del desempeño del kit de estomatitis vesicular desarrollado por Plum Island-APHIS. PANAFTOA entregará la información a APHIS;
8. Que los profesionales de laboratorio de diagnóstico veterinario se familiaricen con las metodologías de gestión de riesgo biológico y las apliquen en la rutina de sus laboratorios para definir y aplicar las condiciones necesarias a ser cumplidas para trabajar con los diferentes tipos de patógenos;
9. Que los representantes de los laboratorios participantes de éste II Taller, informen a sus respectivas autoridades de campo sobre la necesidad de revisar conjuntamente, campo-laboratorio, los formularios de atención a foco, de manera a verificar que sea registrada la información necesaria que permite un correcto diagnóstico diferencial, resaltándose sobre todo la presencia de lesiones cutáneas o sintomatología en humanos que están en contacto con los animales afectados;
10. Que PANAFTOA comunique las conclusiones y recomendaciones del II Taller Internacional de diagnóstico diferencial de fiebre aftosa a todos los países de COSALFA.

CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS

From the topics discussed during the II International Workshop on Differential Diagnosis of Foot-and-Mouth Disease, was highlighted that the differential diagnosis of foot-and-mouth disease must be adequate to the progress in the eradication of the disease and consequently increasing the sensitivity for the diagnosis of other pathologies that could be clinically confused with foot-and-mouth disease. It was concluded that:

- The ability to diagnose diseases included in the differential diagnosis of vesicular diseases is heterogeneous among laboratories supporting the PHEFA;
- There is a need to maintain periodic contacts between specialists from the regional vesicular diseases laboratories to update information and exchange technical experiences;
- Currently PANAFTOSA provides PCR reference materials for foot-and-mouth disease, vesicular stomatitis, IBR, BVD and Bluetongue. It was evidenced the need to identify suppliers of reference materials for other pathogens that cause diseases confused with vesicular diseases;
- It was identified the need to update and harmonize the list of pathogens included in the differential diagnosis as well as the procedures for the diagnosis of diseases confused with vesicular diseases and to adapt the algorithm of differential diagnosis of foot-and-mouth disease to the current scenario of confoundable diseases in the region;
- Participants expressed interest in PANAFTOSA organizing proficiency test exercises for diseases included in the foot-and-mouth disease differential diagnosis;
- Participants expressed interest in PANAFTOSA return to provide the ELISA-CFL sets for identification of New Jersey, Indiana-1 (Indiana) and Indiana-3 (Alagoas) vesicular stomatitis antibodies and considering the offer of a VSV kit produced by Plum Island-APHIS, participants from countries manifested their interest to test that kit;
- The biological risk management algorithm described in the OIE Terrestrial Manual provides the basis for defining the necessary conditions for activities with different pathogens in veterinary diagnostic laboratories.
- It should be ensured that during the investigation process of a suspicion case of vesicular disease the veterinarian registers the information necessary for a correct differential diagnosis;
- The training of the field veterinarian in the collection and dispatch of samples should include topics for the diagnosis of diseases confoundable with vesicular disease.

Based on these conclusions it is recommended:

1. That the countries of the region strengthen the differential diagnosis of foot-and-mouth disease and stimulate at the field level the collection of samples for the different pathogens as well as the appropriate conditions of shipment for their preservation;
2. That laboratories in support of PHEFA ensure that the virological diagnostic tests for foot-and-mouth disease differential diagnosis are implemented in the country, considering at least the following pathogens:
 - Vesicular Stomatitis New Jersey, Indiana, Cocal and Alagoas
 - Seneca virus
 - Orthopox virus
 - Parapox virus
 - Bluetongue
 - Malignant Catarrhal Fever
 - Bovine Viral Diarrhea
 - Bovine Infectious Rhinotracheitis

3. PANAFTOSA to study alternatives to resume the organization of annual meetings of specialists of vesicular laboratories and propose a mechanism to reactivate them;
4. That PANAFTOSA make efforts to resume the production of ELISA-CFL sets for identification and titration of antibodies against VSV New Jersey, Indiana and Alagoas and inform the countries and 45 COSALFA about the medium-term prospects;
5. That the Reference Laboratory of PANAFTOSA identify potential suppliers of reference materials for molecular and serological tests of Poxvirus (Ortho and Para), Malignant Catarrhal Fever and Seneca virus, and to make them available in a harmonized way for use in vesicular diseases diagnostic laboratories of countries in support to PHEFA;
6. That the Reference Laboratory of PANAFTOSA study the possibility of including proficiency test exercises for confoundable diseases within its portfolio of Inter-laboratory exercises, and communicate its opinion to 45 COSALFA;
7. That the representatives of the participating laboratories of this II International Workshop inform PANAFTOSA of the type and quantity of sera (with epidemiological back-up information) that they are able to make available to contribute to the evaluation of the performance of the vesicular stomatitis kit developed by Plum Island -APHIS.PANAFTOSA will deliver the information to Plum Island-APHIS;
8. That professionals from veterinary diagnostic laboratories familiarize themselves with methodologies for biological risk management and implement them routinely in their laboratories to define and apply the necessary conditions required to work with the different types of pathogens;
9. That participants in this II International Workshop inform their respective field authorities of the advantages to review jointly with laboratory, the forms for investigations of cases of vesicular disease, to ensure that the information needed for a correct differential diagnostic, be registered, particularly the occurrence of skin lesions or symptoms in humans who work/live in the investigated premise;
10. That PANAFTOSA communicate the conclusions and recommendations of the II International Workshop for Foot-and-Mouth Disease Differential Diagnosis to countries from COSALFA, as well as to the 45 COSALFA during its annual meeting in 2018.

CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Dos temas debatidos durante o II Taller Internacional de Diagnóstico Diferencial de Fiebre Aftosa conclui-se que o diagnóstico diferencial de febre aftosa deve se adequar aos avanços na erradicação da doença e em consequência aumentar a sensibilidade para o diagnóstico de outras patologias confundíveis com febre aftosa. Conclui-se que:

- A capacidade de realizar diagnóstico de doenças incluídas no diagnóstico diferencial de vesiculares é heterogênea entre os laboratórios de apoio ao PHEFA;
- Existe a necessidade de manter contatos periódicos entre os especialistas de diagnóstico de vesiculares da região, para atualização de informações e experiências técnicas;
- Atualmente PANAFOSA provê materiais de referência para PCR de febre aftosa, estomatite vesicular, IBR, BVD e língua azul. Evidenciou-se a necessidade de identificar provedores de materiais de referência para outros patógenos causantes de enfermidades confundíveis com vesicular;
- Identificou-se a necessidade de atualizar e harmonizar a lista de patógenos incluídos no diagnóstico diferencial assim como os procedimentos para o diagnóstico de enfermidades confundíveis com vesiculares, e adequar o algoritmo de diagnóstico diferencial de febre aftosa ao cenário atual de enfermidades confundíveis na região;
- Os participantes manifestaram interesse em que PANAFOSA organize exercícios de Inter laboratório para enfermidades incluídas no diferencial de febre aftosa.
- Os participantes manifestaram interesse em que PANAFOSA retome a entrega dos sets ELISA-CFL para identificação de anticorpos de estomatite vesicular New Jersey, Indiana-1 (Indiana) e Indiana-3 (Alagoas) e diante o oferecimento de APHIS de testar o kit produzido em Plum Island para identificação de anticorpos para Estomatite Vesicular, manifestaram-se positivamente;
- O algoritmo de gestão de risco biológico descrito no Manual Terrestre de OIE provê a base para definir as condições necessárias para atividades com os diferentes patógenos nos laboratórios de diagnóstico veterinário;
- Deve se assegurar que no processo de atenção a suspeita de enfermidade vesicular se registre informação necessária para um correto diagnóstico diferencial;
- Deve se promover a capacitação do veterinário de campo em colheita e envio de amostras para o diagnóstico de enfermidades confundíveis com vesiculares.

Com base nestas conclusões se recomenda:

1. Que os países da região fortaleçam as atividades de diagnóstico diferencial de febre aftosa e estimulem a nível de campo a colheita de amostras para os diferentes patógenos assim como as condições de envio adequadas para sua preservação,
2. Que os laboratórios de apoio ao PHEFA, se assegurem de que sejam implantadas no país, as provas de diagnóstico virológico para diferencial de febre aftosa, considerando como mínimo os seguintes patógenos:
 - Estomatites Vesicular New Jersey, Indiana, Cocal e Alagoas
 - Senecavirus
 - Orthopoxvirus
 - Parapoxvirus
 - Língua Azul
 - Febre Catarral Maligna
 - Diarréia Viral Bovina
 - Rinotraqueíte Infecciosa Bovina

3. Que PANAFTOSA estude a maneira de retomar a realização de reuniões anuais de especialistas de laboratório de vesiculares e proponha um mecanismo para reativá-las,
4. Que PANAFTOSA realize esforços para retomar a entrega de sets ELISA-CFL para identificação e titulação de anticorpos para estomatite vesicular New Jersey, Indiana e Alagoas e informe aos países e à 45 COSALFA sobre as perspectivas em médio prazo,
5. Que o Laboratório de Referência de PANAFTOSA identifique potenciais provedores de materiais de referência para provas moleculares e serológicas de Poxvirus (Ortho e Para), Febre Catarral Maligna e Senecavirus, e viabilize a disponibilidade dos mesmos, de maneira harmonizada para uso nos laboratórios de diagnóstico de vesiculares de apoio ao PHEFA,
6. Que o Laboratório de Referência de PANAFTOSA estude a possibilidade de incluir exercícios Inter laboratório para enfermidades confundíveis, dentro de seu portfolio de exercícios Inter laboratório, e comunique seu parecer à 45 COSALFA,
7. Que os representantes dos laboratórios participantes desta II Oficina Internacional, informem a PANAFTOSA o tipo e quantidade de soros (com informação epidemiológica de respaldo) que estão em condições de disponibilizar para contribuir a avaliação do desempenho do kit de estomatites vesicular desenvolvido por Plum Island-APHIS. PANAFTOSA entregará a informação a APHIS,
8. Que os profissionais de laboratório de diagnóstico veterinário se familiarizem com as metodologias de gestão de risco biológico as apliquem na rotina de seus laboratórios para definir e aplicar as condições necessárias a ser cumpridas para trabalhar com os diferentes tipos de patógenos,
9. Que os representantes dos laboratórios participantes deste II Taller, informem as suas respectivas autoridades de campo sobre a necessidade de revisar conjuntamente, campo-laboratório, os formulários de atenção a foco, de maneira a verificar que seja registrada a informação necessária que permite um correto diagnóstico diferencial, ressaltando-se sobre tudo a presença de lesões cutâneas ou sintomatologia em humanos que estão em contato com os animais afetados,
10. Que PANAFTOSA comunique as conclusões e recomendações do II Taller Internacional de diagnóstico diferencial de febre aftosa a todos os países de COSALFA.

ANEXOS

ANEXO I

AGENDA

Hotel Dazzler – Av. Aviadores del Chaco y Vasconcellos (frente a Shopping del Sol)
Asunción, Paraguay / 8 a 12 de mayo de 2017

LUNES 08

16:30 - 17:00	Inscripción de participantes
17:15 - 17:45	Palabras de bienvenida – (SENACSA – PANAFTOZA-OPS/OMS)
17:45 - 18:00	Objetivos y metodología de la reunión – <i>Rossana Allende</i>
18:00 - 19:30	Cocktail de bienvenida

MARTES 09

09:00 - 09:40	Criterios para validación de métodos diagnósticos – <i>Rossana Allende</i>
09:45 - 10:30	Estomatitis vesicular - presentación clínica y diagnóstico de laboratorio <ul style="list-style-type: none">• Experiencia de Colombia – <i>Nancy Naranjo</i> (Instituto Colombiano Agropecuario – ICA)• Experiencia de países de América Central – <i>Anarvik Sanchez</i> (Laboratorio de Diagnóstico Veterinario – LADIVES)
10:30 - 10:45	Intervalo
10:50 - 12:00	Estomatitis vesicular – continuación <ul style="list-style-type: none">• Experiencia de Argentina – <i>Andrea Pedemonte</i> (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria – SENASA Argentina)• Experiencia de Brasil - <i>Marcelo Camargos, Mateus Laguardia</i> (Laboratório Nacional Agropecuário - LANAGRO/MG)
12:10 - 13:30	Almuerzo
14:00 - 15:30	Senecavirus – presentación clínica en USA y diagnóstico de laboratorio <i>Consuelo Carrillo</i> (Plum Island Animal Disease Center - APHIS);
15:30 - 15:45	Intervalo
15:50 - 16:50	Senecavirus – presentación clínica en Brasil y diagnóstico de laboratorio <i>Marcelo Camargos, Mateus Laguardia</i> (LANAGRO/MG)
16:50 - 17:30	Mesa redonda para discusión – Moderadores <i>Elizabeth Oviedo</i> (SENACSA) y <i>Daniel Ardaya</i> (LIDIVET)
17:30	Fin actividades del día

MIÉRCOLES 10

08:30 - 10:15	Poxvirus (Ortho y Parapox) – presentación clínica y diagnóstico de laboratorio – <ul style="list-style-type: none"> • Experiencia de Brasil – <i>Maristela Pituco</i> (Instituto Biológico de São Paulo – IBSP) ; <i>Marcelo Camargos, Mateus Laguardia</i> (LANAGRO/MG)
10:20 - 10:30	Intervalo
10:40 - 11:40	Poxvirus (Ortho y Parapox) continuación <ul style="list-style-type: none"> • Experiencia de Colombia – <i>Nancy Naranjo</i> (ICA)
11:40 - 12:15	Mesa redonda para discusión – Moderadores <i>Gabriela Colman</i> (SENACSA) y <i>Euclides de la Torre</i> (AGROCALIDAD)
12:15 - 13:45	Almuerzo
14:00 - 15:30	Lengua Azul – presentación clínica y Diagnóstico de laboratorio: <ul style="list-style-type: none"> • Experiencia de Brasil – <i>Maristela Pituco</i> (IBSP) • Experiencia de Argentina – <i>Andrea Pedemonte</i> (SENASA Argentina)
15:30 - 15:45	Intervalo
15:50 - 16:30	Lengua Azul – presentación clínica y Diagnóstico de laboratorio: <ul style="list-style-type: none"> • Experiencia de Chile – <i>Alfonso García</i> (Servicio Agrícola y Ganadero – SAG)
16:30 - 17:00	Mesa redonda para discusión – Moderadores <i>Salomón Ortiz</i> (SENASA Perú) y <i>Raúl Castro</i> (DILAVE)
17:15	Fin actividades del día

JUEVES 11

09:00 - 10:30	Fiebre Catarral Maligna – presentación clínica y diagnóstico de laboratorio: <ul style="list-style-type: none"> • Experiencia de Brasil – <i>Maristela Pituco</i> (IBSP) • Experiencia de Chile – <i>Alfonso García</i> (SAG) • Experiencia de EEUU – <i>Consuelo Carrillo</i> (APHIS)
10:35 - 10:45	Intervalo
10:50 - 12:00	IBR y BVD – presentación clínica y diagnóstico de laboratorio: <ul style="list-style-type: none"> • Experiencia de Chile – <i>Alfonso García</i> (SAG) • Experiencia de Brasil – <i>Marcelo Camargos, Mateus Laguardia</i> (LANAGRO/MG) • Experiencia de Colombia – <i>Nancy Naranjo</i> (ICA)
12:00 - 13:30	Almuerzo
14:00 - 15:30	Mesa redonda para discusión – Moderadores <i>Zunny Rodríguez</i> (SENACSA) y <i>Euclides de la Torre</i> (AGROCALIDAD)
15:40 - 15:50	Intervalo
16:00 - 17:30	Trabajos de Grupo - PANAFTOUSA-OPS/OMS
17:30	Fin actividades del día

VIERNES 12

09:00 - 10:00	Discusión de Plenario - Infraestructura de laboratorios para diagnóstico diferencial – experiencias de la Región Introducción al tema: <i>Nelly Ortiz</i> (SENACSA)
10:00 - 10:20	Intervalo
10:20 - 12:00	Conclusiones - Fin del II Taller de Diagnóstico Diferencial de Fiebre Aftosa
12:00	Almuerzo

ANEXO II

LISTA DE PARTICIPANTES

ARGENTINA

Andrea Raquel Pedemonte
Dirección de Laboratorio y Control Técnico Servicio
Nacional de Sanidad y Calidad Alimentaria
Av. Sir Alexander Fleming, 1653 Martinez
Buenos Aires – 1640
Tel: (5411) 48361995 FAX: (5411) 48360066
E-mail: maquipedemonte@hotmail.com

Mateus Laguardia Nascimento
Laboratorio Nacional Agropecuario
Ministério da Agricultura, da Pecuária e do
Abastecimento
Av. Rômulo Joviano, s/n Pedro Leopoldo
Minas Gerais - 33600-000
Tel: (31) 3660-9600/ 9634/9635
FAX: (31) 36612383

BOLIVIA

Daniel Wilfredo Ardaya Vaca
Serología de la Fiebre Aftosa
Laboratorio de Investigación y
Diagnóstico Veterinario - LIDIVET
Av. Ejército Nacional, 153 Santa Cruz
Tel: (591) 3322630 / 3352177/3335964
FAX: (591) 3329096 / 3352177/3121561
E-mail: daniel_6099@hotmail.com

CHILE

Alfonso Enrique García Pizarro
Jefe de la Unidad de Virología
Laboratorio Pecuario Central - Servicio
Agrícola y Ganadero
Ruta 68, Km 22, Santiago Región Metropolitana
Tel: (562) 3451928 / 3451927 / 6010405 /
6010307 56 9 7846 4833
FAX: (562) 3451922
E-mail: alfonso.garcia@sag.gob.cl

BRASIL

Edviges Maristela Pituco
Responsável pelo Laboratório de Viroses e Bovídeos
Instituto Biológico de São Paulo
Av. Conselheiro Rodrigues Alves, 1.252 São Paulo
Sao Paulo - 04014-002
Tel: (11) 50871786 / 99625-4444 FAX: (11) 5087176
E-mail: pituco@biologico.sp.gov.br/
maristelapituco@gmail.com

Marcelo Fernandes Camargos
Laboratorio Nacional Agropecuario
Ministério da Agricultura, da Pecuária e
do Abastecimento
Av. Rômulo Joviano, s/n Pedro Leopoldo
Minas Gerais - 33600-000
Tel: (31) 3660-9635 FAX: (31) 36612383
E-mail: marcelo.camargos@agricultura.gov.br

COLOMBIA

Nancy Naranjo Amaya
Médico Veterinário
Instituto Colombiano Agropecuario
Carrera 41, N°. 17 - 8 Zona Industrial
Puente Aranda Bogotá Distrito Capital
Tel: (571) 3686824
FAX: (571) 332-3707
E-mail: nancy.naranjo@ica.gov.co

ECUADOR

Euclides Jose De La Torre Medranda
AGROCALIDAD
Provincia Pichincha - Pichincha
Tel: () 0997477526

ESTADOS UNIDOS

Consuelo Carrillo Garcia
Veterinary Medical Officer
Plum Island Animal Disease Center Animal and Plant
Health Inspection Service - U.S.
Department of Agriculture
P.O. Box 848, New York - 11944
Tel: (1631) 323-3352 FAX: (1631) 323-3356
E-mail: consuelo.carrillo@aphis.usda.gov

Elizabeth Oviedo Benitez
Chefa da Divisão de Febre Aftosa
Microbiología de Alimentos
Servicio Nacional de Calidad y Salud Animal
Ruta Marechal Estigarribia, Km 10 1/2
San Lorenzo, San Lorenzo Central
Tel: (59521) 576435*501374/507862/502042
595-981-865.796
FAX: (59521) 576435/501374/514965
E-mail: elioviedo@hotmail.com

GUYANA

Johaine Ekeema McAllister
Guyana Livestock Development Authority
Ministry of Agriculture
Regent and Vlissengen Roads
Tel: (592) 220-6557 / 220-6556 / 220-2864
FAX: (592) 2272978/2275527

Gabriela Colmán
Directora de la Enfermedades en Programa –
DIGELAB
Servicio Nacional de Calidad y Salud Animal
Ruta Marechal Estigarribia, Km 10 1/2 San Lorenzo,
San Lorenzo Central
Tel: (59521) 584496/505.727/501.374
FAX: (59521) 507.883
E-mail: gabicolman@senacsa.gov.py
gabicolman@senacsa.gov.py

PANAMÁ

Anarvik Sánchez
Directora
Laboratorio de Diagnóstico de Enfermedades
Vesiculares
Calle Manuel E Melo, 573
Tel: (507) 220 2111/220-2500 FAX: (507) 290-2718
E-mail: ivalu04@yahoo.com; ladives@hotmail.com

Hugo Federico Idoyaga Benitez
Presidente
Servicio Nacional de Calidad y Salud Animal
Ruta Marechal Estigarribia, Km 10 1/2 San Lorenzo,
San Lorenzo Central
Tel: (59521) 576435/201374/507862
595981203623/ 981438285
FAX: (59521) 576 435
E-mail: presidencia@senacsa.gov.py

PARAGUAY

Carlos Ramírez
Servicio Nacional de Calidad y Salud Animal
Ruta Marechal Estigarribia, Km 10 1/2
San Lorenzo, San Lorenzo Central
Tel: (59521) 576435 - 501374/507862/502042
FAX: (59521) 576435/501374/514965
E-mail: caramirez@senacsa.gov.py

Leonarda Irala
Coordinadora
Servicio Nacional de Calidad y Salud Animal
Ruta Marechal Estigarribia, Km 10 1/2
San Lorenzo, San Lorenzo Central
Tel: (59521) 576435 - 501374/507862/502042
FAX: (59521) 576435/501374/514965
E-mail: lirala@senacsa.gov.py
lirala@senacsa.gov.py

David Javier Melgarejo Vera
Técnico División Fiebre Aftosa
Servicio Nacional de Calidad y Salud Animal
Ruta Marechal Estigarribia, Km 10 1/2
San Lorenzo, San Lorenzo Central
Tel: (59521) 59581501374
FAX: (59521) 576435/501374/514965
E-mail: david.melgarejo@hotmail.com

Liz Karina Ortiz
Servicio Nacional de Calidad y Salud Animal
Ruta Marechal Estigarribia, Km 10 1/2
San Lorenzo, San Lorenzo Central
Tel: (59521) 576435 - 501374/507862/502042
FAX: (59521) 576435/501374/514965

Lorena Lagrave
Servicio Nacional de Calidad y Salud Animal
Ruta Marechal Estigarribia, Km 10 1/2
San Lorenzo, San Lorenzo Central
Tel: (59521) 576435*501374/507862/502042
FAX: (59521) 576435/501374/514965

María Gabriela Quintana Ovelar
Jefe de la Unidad de Enf. Vesiculares
Servicio Nacional de Calidad y Salud Animal
Ruta Marechal Estigarribia, Km 10 1/2
San Lorenzo, San Lorenzo Central
Tel: (59521) 510962/505727/576435
FAX: (59521) 624.210
E-mail: gaby13_quin@hotmail.com

Nelly Estella Ortíz Rodríguez
Directora General de Laboratorio – DIGELAB
Servicio Nacional de Calidad y Salud Animal
Ruta Marechal Estigarribia, Km 10 1/2
San Lorenzo, San Lorenzo Central
Tel: (59521) 590.450 FAX: (59521) 590.450
E-mail: nortiz@senacsa.gov.py

Norman Daniel Ramirez Aguilera
Coordinador Técnico
Servicio Nacional de Calidad y Salud Animal
Ruta Marechal Estigarribia, Km 10 1/2 San Lorenzo,
San Lorenzo Central
Tel: (59521) 576749 / FAX: (59521) 576749
E-mail: nramirez@senacsa.gov.py

Paola Cilia
Jefa de la División Enfermedades Vesiculares –
DIGELAB
Servicio Nacional de Calidad y Salud Animal
Ruta Marechal Estigarribia, Km 10 1/2
San Lorenzo, San Lorenzo Central
Tel: (59521) 576435*501374/507862/502042
FAX: (59521) 576435/501374/514965

Primo Ricardo Feltes Bagnoli
Director de Servicios Técnicos – DIGESETEC
Servicio Nacional de Calidad y Salud Animal
Ruta Marechal Estigarribia, Km 10 1/2
San Lorenzo, San Lorenzo Central
Tel: (59521) 523442/576749/501374/505727/
507862 595981590946 FAX: (59521) 507863
E-mail: pfeltes@senacsa.gov.py

Rosanna Bóveda
Técnica del Departamento de Enf. Vesiculares –
DIGELAB
Servicio Nacional de Calidad y Salud Animal
Avda. Ciencias Veterinarias 15 andar y 2da,
San Lorenzo Central
Tel: (59521) (021) 524806 / FAX: (59521) (021) 523442
E-mail: ralmeida@senacsa.gov.py

Victor Darío Maldonado
Director - DIGESETEC
Servicio Nacional de Salud Animal
Caaguazu
Tel: (59521) 576749 595 986267560
FAX: (59521) 576.749
E-mail: vmaldonado@senacsa.gov.py

Zunny Mabel Rodriguez de Ramírez
Chefa da Divisão de Febre Aftosa
Servicio Nacional de Calidad y Salud Animal
Ruta Marechal Estigarribia, Km 10 1/2
San Lorenzo, San Lorenzo Central
Tel: (59521) 501-374 / 505.727 / FAX: (59521) 507.883
E-mail: zmrodriguez@senacsa.gov.py
zunyrodriguez@gmail.com

PERÚ

Salomon Antonio Ortiz Rojas
Jefe de Laboratorio de Enfermedades Vesiculares
Servicio Nacional de Sanidad Agraria
Ministerio de Agricultura
Av. La Molina, 1915 Lima
Tel: (511) 313 3300 anexo 1333
FAX: (511) 3401486/3133315/3133304
E-mail: sortiz@senasa.gob.pe

URUGUAY

Edin Raúl Castro Janer
Técnico Veterinario
División Laboratorios Veterinarios
"Miguel C. Rubino" - DILAVE
Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca
Ruta 8, Km 17.500, Montevideo
Tel: (5982) 2221063
FAX: (5982) 2221157
E-mail: rcastro@dilave.gub.uy

ORGANISMO INTERNACIONAL

**Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOSA - OPS/OMS**

Arianna Drumond Lage
Veterinaria - Laboratório de Diagnóstico de Raiva
del Centro Pan-American de Febre Aftosa
Av. Romulo Joviano, s/n - CEP 33600-000 -
Pedro Leopoldo - MG - Brasil
Tel: (5521) (31) 3660 9600 / (31) 9751 8251
FAX: (5521) 3661-9001
E-mail: adrumond@paho.org /
ariannalage@yahoo.com.br

Rossana Allende
Virologista - Laboratorio de Referencia
del Centro Pan-American de Febre Aftosa
Av. Romulo Joviano, s/n - CEP 33600-000 - Pedro
Leopoldo - MG - Brasil
Tel: (5521) 3661-9064 / (31) 3660 9726 / 81615490
FAX: (5521) 3661-9001
E-mail: rallende@panaftosa.ops-oms.org /
rallende@ms.microlink.com.br

Jaqueleine Bastos Santos
Av. Governador Leonel de Moura Brizola, 7778
Duque De Caxias Rio de Janeiro - Brasil CEP 25045-002
Tel: (5521) 3661-9000
FAX: (5521) 3661-9001

ANEXO III

INTRODUCCIÓN

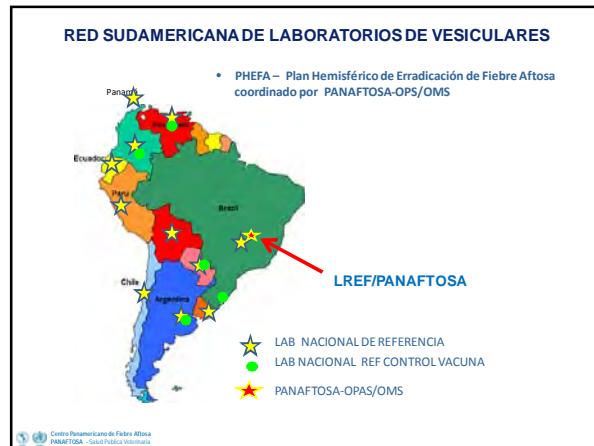
**II TALLER INTERNACIONAL DE
DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE FIEBRE AFTOSA**

Asunción, Paraguay | 8 a 12 de mayo de 2017

INTRODUCCIÓN

Rossana M. Allende
Laboratorio de Referencia - LREF
PANAFTOSA-OPS/OMS

Organización Panamericana de la Salud
Organización Mundial de la Salud
Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOSA - OPS/OMS
Salud Pública Veterinaria



FIEBRE AFTOSA: ESPECIES SUCEPTIBLES

Animales Domésticos biungulados:

- Bovinos y bufalos
- Ovinos
- Caprinos
- Suinos

llama
alpaca
camello

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOSA - Salud Pública Veterinaria

FIEBRE AFTOSA: ESPECIES SUCEPTIBLES

Otros biungulados silvestres:

- Jabalí
- Antílopes
- Venados
- Bisonte

Animales silvestres no biungulados:

- Capibara
- Hedgehog
- Nutria
- Armadillo

➤ No demostrada importancia epidemiológica

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOSA - Salud Pública Veterinaria

ETIOLOGIA y SINTOMAS CLINICOS

Virus de Fiebre Aftosa

- Familia: Picornavirus
- Genero: *aftovirus*
- Ácido nucleico: RNA (+)

TIPOS: O, A, C, SAT 1, 2 e 3, ASIA 1

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOSA - Salud Pública Veterinaria





II TALLER INTERNACIONAL DE DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE FIEBRE AFTOSA

- OBJETIVO:**
 - Crear un foro de discusión entre los especialistas de los laboratorios de vesiculares de la región para fortalecer el diagnóstico de enfermedades confundibles con fiebre aftosa, en el contexto del PHEFA
 - Identificar necesidades de armonización de metodologías

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOSA - Salud Pública Veterinaria

II TALLER INTERNACIONAL DE DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE FIEBRE AFTOSA

- METODOLOGIA:**
 - Presentaciones de las experiencias de los laboratorios de la región en el diagnóstico de enfermedades virales incluidas en la agenda
 - Discusiones en plenario con moderadores que colocarán la visión de OIE
 - Elaboración de un informe final con la colaboración de relatores y moderadores

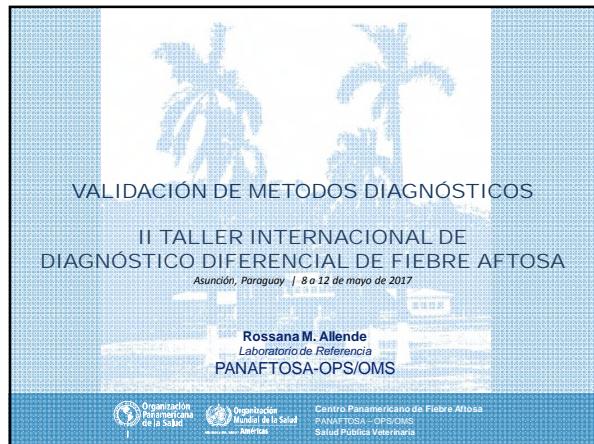
Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOSA - Salud Pública Veterinaria



www.paho.org/panaftosa

rallende@paho.org
Twitter/panaftosa_inf Facebook/kmcPANAFTOSA

VALIDACIÓN DE MÉTODOS



VALIDACIÓN de MÉTODOS de DIAGNÓSTICO

Validación es el proceso utilizado para determinar si un método es apropiado para un determinado propósito

Un método validado provee consistentemente resultados que permiten clasificar la muestra según el propósito, con un grado predeterminado de certidumbre estadística

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOUSA - Salud Pública Veterinaria

CRITERIOS a CONSIDERAR en el DESARROLLO y VALIDACIÓN de MÉTODOS de DIAGNÓSTICO

- Definición del propósito
- Optimización
- Estandarización
- Repetibilidad
- Sensibilidad analítica
- Especificidad analítica
- Definición de punto de corte (cut-off)
- Sensibilidad diagnóstica
- Especificidad diagnóstica
- Reproducibilidad
- Adecuación al propósito (fitness for purpose)

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOUSA - Salud Pública Veterinaria

DEFINICIÓN DEL PROPÓSITO

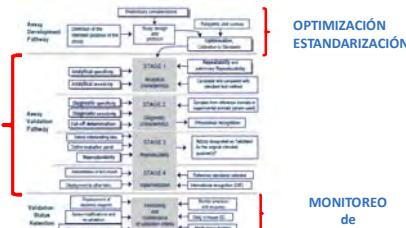
- Contribuir a la demostración de ausencia de infección en la población
 - Certificar ausencia de infección o presencia del patógeno en animales o sus productos
 - Contribuir a la erradicación de la enfermedad o a la eliminación de la infección en poblaciones definidas
 - Confirmar diagnóstico de casos clínicos o sospechas
 - Estimar prevalencia de infección en soporte a análisis de riesgo
 - Determinar estado inmunológico de animales individuales o de rebaños
 - Otros
- **Necesario definir también:**
- Especie animal alvo del test
 - Patógeno o condición alvo
 - Tipo de muestra (matriz)

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOUSA - Salud Pública Veterinaria

DESARROLLO y VALIDACIÓN

OIE MANUAL TERRESTRE Capítulo 1.1.6

ETAPAS INICIALES de VALIDACIÓN



OPTIMIZACIÓN ESTANDARIZACIÓN

MONITOREO de VALIDACION

LA VALIDACIÓN ES UN PROCESO CONTINUO QUE DEBE MONITOREARSE PERIODICAMENTE

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOUSA - Salud Pública Veterinaria

VARIABLES que AFECTAN el MÉTODO

- 1. La muestra:** existen factores que afectan la composición y la concentración del analito en la muestra:

- especie huésped y raza
- edad, sexo
- Estado nutricional
- preñez,

FACTORES BIOLOGICOS ATRIBUIDOS AL HUESPED

- Vacunaciones o infecciones
- Anticuerpos pasivos (calostro)
- Localización geográfica

VARIABLES EXTERNAS

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOUSA - Salud Pública Veterinaria

VARIABLES que AFECTAN el MÉTODO

2. El sistema: factores físicos, químicos, biológicos y de operador que afectan la capacidad de la prueba en detectar el analito:

- Instrumentos
- Errores de operador
- Calibración de instrumentos
- Calidad de insumos
- Calidad del agua
- Temperaturas y tiempos de incubación
- Sustancias que puedan presentar ración cruzada con el analito,

 Centro Panamericano de Fiebre Aflcosa
PAHO/WHO - Salud Pública Veterinaria

VARIABLES que AFECTAN el MÉTODO

3. El resultado: predicción de la condición del animal/población en base al resultado obtenido.

Un método es apropiado cuando su resultado refleja en forma consistente y correcta la condición real del animal/población

- Especificidad analítica
- Sensibilidad analítica
- Especificidad diagnóstica
- Sensibilidad diagnóstica

 Centro Panamericano de Fiebre Aflcosa
PAHO/WHO - Salud Pública Veterinaria

DESARROLLO del MÉTODO

El desarrollo de un método es dependiente de **muestras de referencia** conteniendo el analito alvo

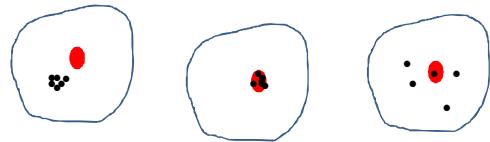
- Matriz/matrizes específica/s donde se encuentra el analito
 - Suero
 - Fluidos
 - Tejidos/órganos
 - Ácidos nucleicos o construcciones genómicas consistentes con el analito alvo
- Las muestras deben ser de la especie y población a la cual se aplica el método

 Centro Panamericano de Fiebre Aflcosa
PAHO/WHO - Salud Pública Veterinaria

PRECISION y EXACTITUD

Precisión: es una medida de dispersión de los resultados de una muestra corrida repetidamente.
Una prueba precisa tiene poca dispersión

Exactitud: es la medida de acuerdo entre el valor obtenido y el valor esperado



Curvas de calibración: establecen la faja de trabajo en la cual el método demuestra precisión y exactitud satisfactorias para el uso pretendido

 Centro Panamericano de Fiebre Aflcosa
PAHO/WHO - Salud Pública Veterinaria

ROBUSTEZ

- Es la capacidad de que el desempeño del método no sea afectado por variaciones pequeñas de situación que pueden ocurrir en determinado laboratorio.
- En la etapa de optimización, variaciones en las condiciones del método deben ser incluidas deliberadamente para verificar la robustez del mismo.

 Centro Panamericano de Fiebre Aflcosa
PAHO/WHO - Salud Pública Veterinaria

REACTIVOS STANDARD

- **Standard de referencia internacional/nacional**
 - Extensamente caracterizados
- **In-house standard (primario)**
 - calibrado en comparación con el standard de referencia internacional/nacional
 - Extensamente caracterizado
 - En volumen suficiente para uso en calibración del standard de trabajo
- **Standard de trabajo (working standard-secundario)**
 - Varios
 - Usados en rutina como control de proceso
 - Calibrados en comparación con el in-house standard
 - Preparados en gran volumen, fraccionado y almacenado para uso de rutina en cada corrida de prueba

 Centro Panamericano de Fiebre Aflcosa
PAHO/WHO - Salud Pública Veterinaria

CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS del DESEMPEÑO

- Precisa un diseño estadístico adecuado para el objetivo deseado
- Precisa la participación de un experto en la enfermedad
- **Repetibilidad:** es el grado de acuerdo entre resultados intra y entre corridas en un mismo laboratorio. Se puede expresar como desvío estandar, coeficiente de variación u otras opciones
- **Especificidad Analítica:** es la habilidad del método de distinguir el analito alvo entre otros analitos no-alvo (reacciones cruzadas)
 - Selectividad
 - Exclusividad
 - Inclusividad
- **Sensibilidad Analítica:** es el límite de detección del método. Se considera la cantidad estimada del analito presente en una matriz específica, que es capaz de ser detectado por el método en validación.

 Centro Panamericano de Fiebre Aflcosa
CPFA - Salud Pública Venezuela

DESEMPEÑO DIAGNÓSTICO del MÉTODO

- **Sensibilidad diagnóstica (SnD):** proporción de muestras de animales conocidamente infectados con resultado positivo en la prueba
- **Especificidad diagnóstica (SpD):** proporción de muestras de animales conocidamente no infectados con resultado negativo en la prueba
- La SnD y la SpD son estimados a partir de colecciones de muestras:
 - con histórico epidemiológico conocido (verdaderos positivos o negativos)
 - representativas del país o región donde será aplicada la prueba

 Centro Panamericano de Fiebre Aflcosa
CPFA - Salud Pública Venezuela

DESEMPEÑO DIAGNÓSTICO del MÉTODO

- El número de muestras con histórico conocido necesarias para estimar SnD y SpD dependerá del nivel de confianza que se desee
- Típicamente se trabaja con un nivel de confianza elevado ($\geq 95\%$) al estimar la SeD y la SpD.
- Asumiendo un margen de error pequeño (2%) – se precisa un número elevado de muestras
- Asumiendo un margen de error grande (5%) – se precisa un número menor de muestras
- Es necesario definir la criticidad del error que aceptamos en el resultado

 Centro Panamericano de Fiebre Aflcosa
CPFA - Salud Pública Venezuela

NÚMERO TEÓRICO DE MUESTRAS CON HISTÓRICO CONOCIDO

SnD y SpD estimados	2% error aceptado en la estimación de SnD y SpD			5% error aceptado en la estimación de SnD y SpD		
	Nivel de Confianza			Nivel de Confianza		
	90%	95%	99%	90%	95%	99%
90%	610	864	1493	98	138	239
92%	466	707	1221	75	113	195
94%	382	542	935	61	87	150
95%	372	456	788	60	73	126
96%	260	369	637	42	59	102
97%	197	279	483	32	45	77
98%	133	188	325	21	30	52
99%	67	95	164	11	15	26

Fuente: Jacobson, 1998

EJEMPLOS DE POBLACIONES DE REFERENCIA

- Variables importantes de la población alvo tienen que estar representadas:
 - Especie/s animal
 - Edad
 - Sexo
 - Raza
 - Estado de infección
 - Histórico de vacunación
 - Histórico de la enfermedad en el rebaño
 - Lugar de origen
 - Otros

 Centro Panamericano de Fiebre Aflcosa
CPFA - Salud Pública Venezuela

MUESTRAS NEGATIVAS DE REFERENCIA

- Animales con historia de nunca haber estado en contacto con el patógeno
- Generalmente se obtienen de regiones libres de la enfermedad
- Deben ser de rebaños con características similares a aquellas de la población alvo de la prueba

 Centro Panamericano de Fiebre Aflcosa
CPFA - Salud Pública Venezuela

MUESTRAS POSITIVAS DE REFERENCIA

- Verdaderas positivas (con aislamiento del patógeno) — a veces difíciles de encontrar en número suficiente
- Puede recurirse a muestras clasificadas como positivas por otra prueba con suficiente nivel de exactitud (tablas de 2 x 2) — asume una prueba como *gold standard*
- Animales experimentalmente infectados o vacunados

 Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOSA - Salud Pública Veterinaria

CÁLCULO de SnD y SpD

Método en validación	Muestras de Referencia	
	Positivos verdaderos (279)	Negativos verdaderos (95)
Resultado Positivo	270	TP
Resultado Negativo	9	FN
		TN
		88
		$SnD = TP / (TP + FN) = 96,8\%$
		$SpD = TN / (TN + FP) = 92,6\%$

En el ejemplo se asumió que:

- La SnD era del 97% y la SpD era de 99%
- El nivel de confianza requerido para ambas estimativas era de 95%
- El margen de error para las estimativas era de 2%

Atención!!!

LOS RESULTADOS DEL CALCULO DE SpD INDICAN QUE DEBO CORREGIR EL NÚMERO DE MUESTRAS PARA ESTIMAR CORRECTAMENTE LA SpD

SnD y SpD estimados	2% error aceptado en la estimación de SnD y SpD			5% error aceptado en la estimación de SnD y SpD		
	Nivel de Confianza			Nivel de Confianza		
	90%	95%	99%	90%	95%	99%
90%	610	864	1493	98	138	239
92%	466	707	1221	75	113	195
94%	382	542	935	61	87	150
95%	372	456	788	60	73	126
96%	260	369	637	42	59	102
97%	197	279	483	32	45	77
98%	133	188	325	21	30	52
99%	67	95	164	11	15	26

Fuente: Jacobson, 1998

 Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOSA - Salud Pública Veterinaria

VERIFICACIÓN de KITS/SETs COMERCIALES

- Verificar que el método cumple con los parámetros mencionados por el productor
- Verificar Sensibilidad y Especificidad Analítica (Etapa 1 de Validación)
 - Usar materiales de referencia conocidos
- Verificar Sensibilidad y Especificidad Diagnóstica (Etapa 2 de Validación)
 - Usar matriz adecuada
 - Usar materiales provenientes de la población alvo

 Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOSA - Salud Pública Veterinaria

 Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOSA - Salud Pública Veterinaria

MÉTODO VALIDADO

Completó Etapa 3



MONITOREO CONTINUO

 Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOSA - Salud Pública Veterinaria

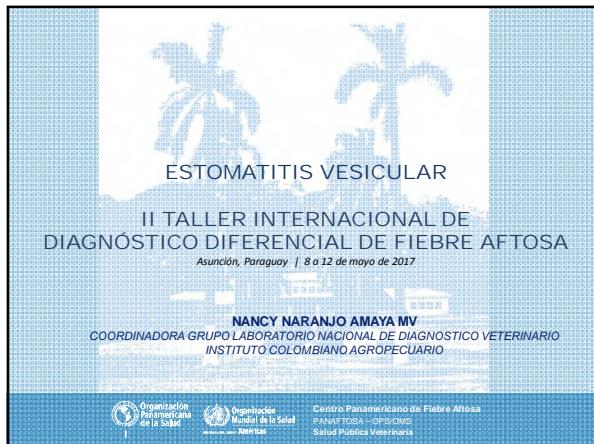
www.paho.org/panaftosa



rallende@paho.org

Twitter/panaftosa_inf Facebook/kmcPANAFTOSA

ESTOMATITIS VESICULAR



ESTOMATITIS VESICULAR

HUÉSPEDES

- Afecta principalmente a équidos, ganado vacuno y porcino.
- Las ovejas y las cabras pueden desarrollar signos clínicos.
- Camélidos sudamericanos
- Detectado Acv en muchas otras especies incluyendo ciervos, venado de cola blanca, Antilocapra americana, murciélagos, mapaches, zarigüeyas, Linceos, osos, perros, primates no humanos, conejos, roedores, pavos y patos.
- Se han infectado experimentalmente cobayas, hámsteres, ratones, hurones, zarigüeyas, pollos.
- Humanos (zoonosis menor)

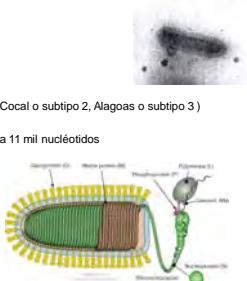


ESTOMATITIS VESICULAR

Orden: Mononegavirales
Familia: Rhabdoviridae
Género: Vesiculovirus.
Subtipos: EV New Jersey (VSV-NJ), EV Indiana (VSV-IN). (Indiana 1, Cocal o subtipo 2, Alagoas o subtipo 3)
Genoma: Una molécula de RNA de polaridad negativa 11 mil nucleótidos
Codifica cinco genes estructurales

Nucleocápside (N)*
Fosfoproteína (P)*
Matriz (M)**
Glicoproteína (G)**
Polimerasa (L)*

* Forman la nucleocápside y el complejo transcripcional del virus y son necesarias para la replicación viral.
** Forman la estructura viral que envuelve a la nucleocápside y le da forma de bala.



Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFD - Salud Pública Veterinaria

ESTOMATITIS VESICULAR

Distribución Geográfica

- Francia (1915 y 1917).
- África meridional (1886 y 1887).
- Endémica: Sur de México, América Central y el norte de América del Sur. VSV-NJ y VSV-IN.
- Regularmente causan brotes en áreas de América del Norte y del Sur donde no son endémicas

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFD - Salud Pública Veterinaria

ESTOMATITIS VESICULAR

TRASMISION

- Transmisión por vectores: artrópodos (*Phlebotomus*, *Aedes*, *Simuliidae*, *Lutzomyia culicoides* etc.)
- A partir de un animal infectado son la saliva, exudado o epitelio de vesículas abiertas. (Nasofaringea, Intradérmica y Mecánica).

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFD - Salud Pública Veterinaria

The map shows the distribution of Vesicular Stomatitis Virus (VSV) across the Americas. Red star symbols indicate the presence of the virus in countries such as Canada, United States, Mexico, Central America, South America, and several Caribbean islands. The map also labels the Océano Atlántico (Atlantic Ocean) and Océano Pacífico (Pacific Ocean). Specific geographical features like the Collo de Mé�otz, Tercer de Cáncer, Yar-Caro, and Trópico de Capricornio are marked. The Arctic Circle is also shown.

1

ESTOMATITIS VESICULAR

Distribución Geográfica OIE



■ Señalada como presente ■ Señalada como ausente ■ Datos no disponibles o incompletos

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
FAO/PANAMFOA - Salud Pública Veterinaria

LESIONES



ICA- EPIDEMIOLOGIA VETERINARIA 2017

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
FAO/PANAMFOA - Salud Pública Veterinaria

LESIONES



ICA- EPIDEMIOLOGIA VETERINARIA 2017

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
FAO/PANAMFOA - Salud Pública Veterinaria

LESIONES



ICA- EPIDEMIOLOGIA VETERINARIA 2017

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
FAO/PANAMFOA - Salud Pública Veterinaria

LESIONES



ICA- EPIDEMIOLOGIA VETERINARIA 2017

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
FAO/PANAMFOA - Salud Pública Veterinaria

LESIONES



ICA- EPIDEMIOLOGIA VETERINARIA 2017

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
FAO/PANAMFOA - Salud Pública Veterinaria

LESIONES



Centro Panamericano de Fiebre Aflcosa
PANAFIOSA - Salud Pública Veterinaria

LESIONES



ICA- EPIDEMIOLOGIA VETERINARIA 2017

Centro Panamericano de Fiebre Aflcosa
PANAFIOSA - Salud Pública Veterinaria

LESIONES HUMANOS

- Conjuntivitis.
- Síntomas compatibles con influenza.
- Escalofríos.
- Náuseas.
- Vómito.
- Cefalea.
- Mialgia.
- Faringitis.
- Lesiones vesiculares en faringe, mucosa nasal, lengua, labios.
- Encefalitis: Puede ocurrir en niños.

Centro Panamericano de Fiebre Aflcosa
PANAFIOSA - Salud Pública Veterinaria

LESIONES HUMANOS



ICA-Epidemiología Veterinaria Medellín

Centro Panamericano de Fiebre Aflcosa
PANAFIOSA - Salud Pública Veterinaria

LESIONES



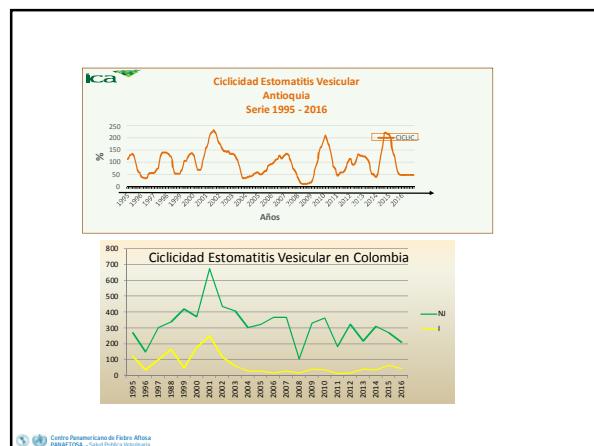
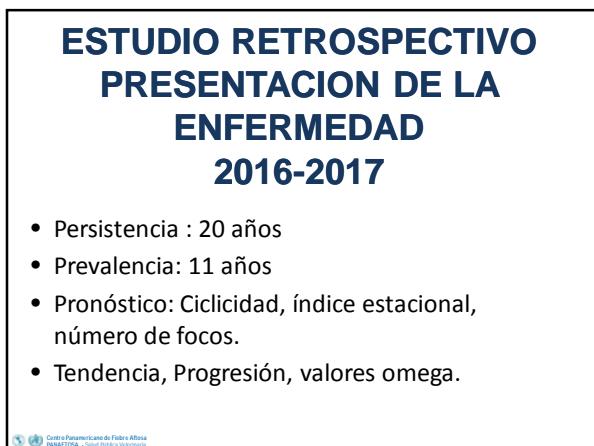
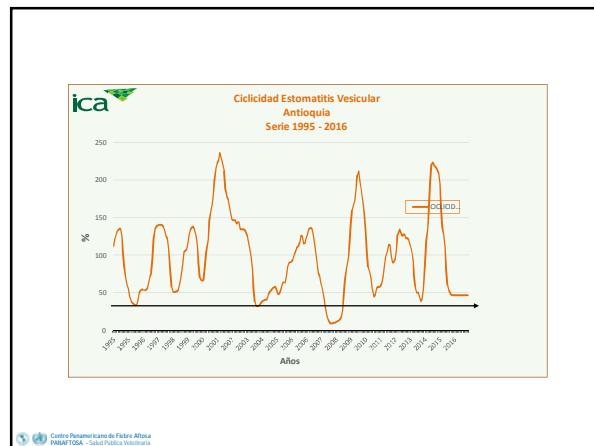
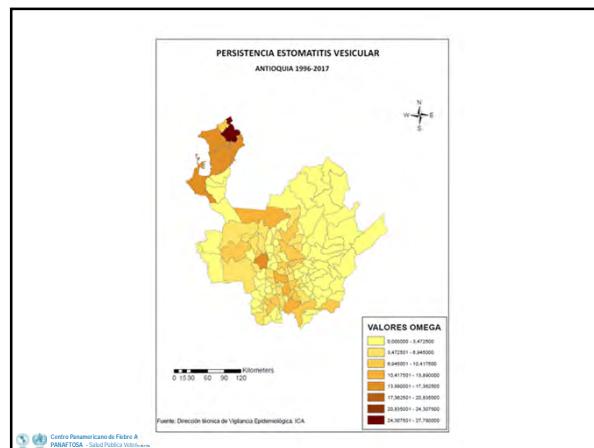
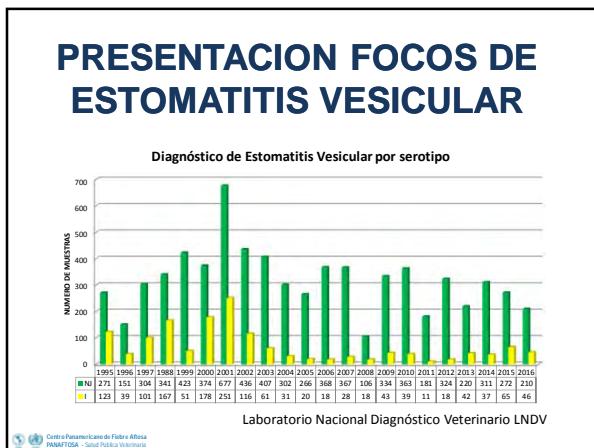
ICA- EPIDEMIOLOGIA VETERINARIA 2017

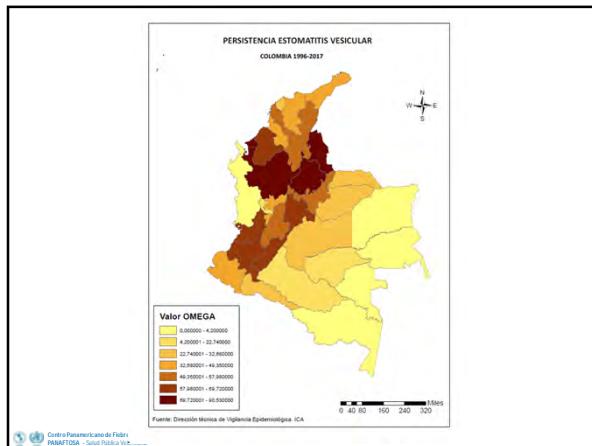
Centro Panamericano de Fiebre Aflcosa
PANAFIOSA - Salud Pública Veterinaria

SITUACION DE LA ESTOMATITIS VESICULAR EN COLOMBIA

- Fue diagnosticada por primera vez en 1929 durante un brote ocurrido en el departamento del Huila (Laserna, 1966, citado por González et al. 1979).
- 1950 fueron detectados dos brotes.
- 1975 el número ascendió a 109.
- 1989 a 1994 se presentaron un promedio de 380 focos por año, con dos picos epidémicos de 375 y 340 focos durante 1991 para los serotipos NJ y IND respectivamente (Arbeláez et al., 1995).
- Entre 1994 y mayo de 1998 se han confirmado 1465 focos, de los cuales 1045 corresponden al serotipo New Jersey y los 420 restantes al Indiana (Laboratorio Nacional de Enfermedades Vesiculares, ICA).

Centro Panamericano de Fiebre Aflcosa
PANAFIOSA - Salud Pública Veterinaria





CONCLUSIONES PRESENTACION ENFERMEDAD DEN COLOMBIA

- Condiciones ecológicas, climatológicas y epidemiológicas que determinan la presencia de la enfermedad.
- Depende de algunas condiciones meteorológicas (transición de estación seca a lluviosa y viceversa y el ciclo de vida de los vectores)

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFOSA - Salud Pública Veterinaria



VACUNAS COMERCIALES

NJ-Caldas 74-7546.
I-Antioquia 85-15577



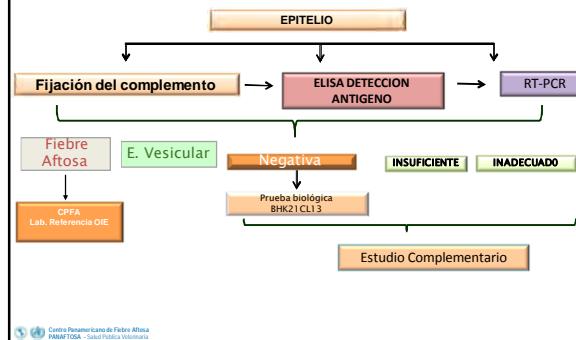
Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFOSA - Salud Pública Veterinaria

CONCLUSIONES PRESENTACION ENFERMEDAD DEN COLOMBIA

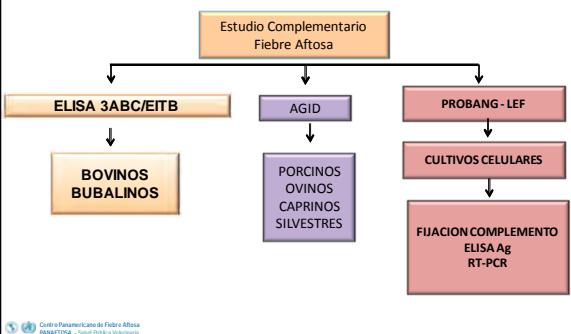
- Se presenta desde las tierras cálidas con temperaturas 28°C, hasta zonas frías con temperaturas de 8°C y alturas de 2.700msnm.
- Participación de diferentes especies de vectores y reservorios en el mantenimiento de la infección en las zonas endémicas.
- El impacto económico de la enfermedad es alto ya que no solo se presenta en hatos lecheros sino en hatos de levante y ceba.

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFOSA - Salud Pública Veterinaria

DIAGNOSTICO VESICULARES



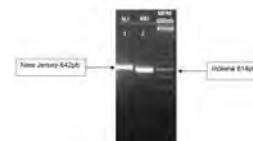
DIAGNOSTICO ENFERMEDADES VESICULARES



ESTOMATITIS VESICULAR

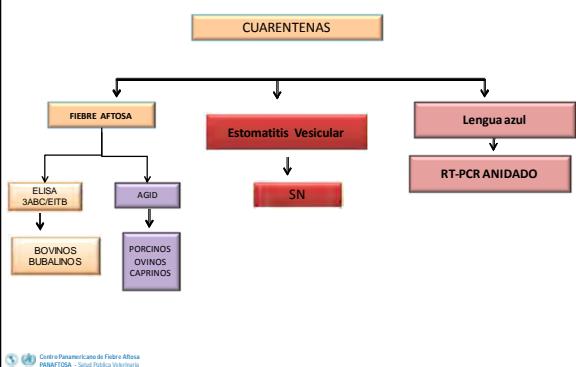
DETECCIÓN DEL VIRUS DE ESTOMATITIS VESICULAR POR RT PCR CONVENCIONAL (GEN POLIPROTEINA)

Agente	Nombre del primer	Secuencia 5'-3'
Estomatitis New Jersey	NJ-P102	5'-GAG AGG ATA AAT ATCTCC-3'
	NJ-P744	5'-GGG CAT ACT GAA GAA TA-3'
Estomatitis Indiana	IN-P179	5'-GCA GAT GAT TCT GAC AC-3'
	IN-P793	5'-GAC TCT YGC CTG RTT GTA-3'

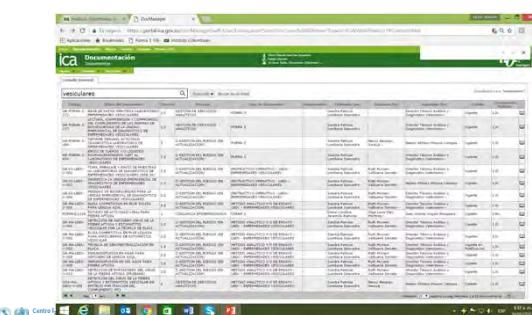


Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFESA - Salud Pública Veterinaria

DIAGNOSTICO VESICULARES



HERRAMIENTAS PARA EL ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD. DOC MANAGER



ESTOMATITIS VESICULAR

Fijación complemento
ELISA Tipificación FA/EV
RT-PCR Convencional
Aislamiento en cultivos celulares
Seroneutralización.



Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFESA - Salud Pública Veterinaria

ISO/IEC:17025:2005

- 12 Metodologías acreditadas por ONAC.
- [ONAC 2017.pdf](#)
- Todo el LNDV se encuentra bajo los mismos parámetros.



Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFESA - Salud Pública Veterinaria

The screenshot shows a computer desktop with a browser window open to the ICA-PANAFTOSA website. The page displays a search form for 'ESPECIFICIDAD DE METODOS' (Diagnostic Methods Specificity). The search fields include 'Unidad Local de Implementación' (Local Unit of Implementation) set to 'Táchira' and 'Centro Regional' (Regional Center) also set to 'Táchira'. Below the form is a table with columns: 'presentación', 'Fecha Referencia', 'present. Local de implementación', 'Unidad Local de Implementación', 'Unidad Regional', and 'Resumen'. The table lists various entries, such as 'ELISA', '2015/01/01', 'TÁCHIRA', 'TÁCHIRA', 'TÁCHIRA', and 'resumen1'. At the bottom left is the PANAFTOSA logo, and at the bottom right is the page number '37'.

www.paho.org/panaftosa



Twitter/[panaftosa_inf](#) Facebook/[kmcPANAFTOSA](#)

FORTALEZA : COOPERACION DE PANAFTOSA

- ❖ 2015: Misión ICA-PANAFTOSA .Armonización métodos diagnósticos.
- ❖ Pruebas de Proeficiencia (Interlaboratorios):
 - ❖ Detección de anticuerpos: ELISA 3ABC/EITB.
 - ❖ Detección de antígeno: PCR y ELISA detección de Antígeno.
- ❖ Suministro bajo la modalidad de Compra de reactivos.
- ❖ Apoyo técnico.
- ❖ Donación de controles.

The logo consists of a small globe icon followed by the text 'Centro Panamericano de Fiebre Aftosa PANAFTOSA - Salud Pública Veterinaria'.

38

DIFICULTADES

- El diagnóstico se realiza como diferencial de Fiebre Aftosa, ya que EV es una enfermedad endémica para el país y no existe un programa propio para su control.
- Limitación presupuestal para hacer investigación y adquisición de equipos para biología molecular de última generación.
- Limitaciones de tipo Contractuales.
- No tiene un kit comercial para detección de Acs EV que pueda ser adquirido fácilmente.
- Falta de proveedor de sueros hiperinmunes para poder realizar la prueba de fijación de complemento ya que se usa de preferencia cuando se recibe las muestras los fines de semana o festivos.
- Falta del un laboratorio NSB3a o 4 OIE para hacer investigación diagnóstica.

The logo consists of a small globe icon followed by the text 'Centro Panamericano de Fiebre Aftosa PANAFTOSA - Salud Pública Veterinaria'.

**ESTOMATITIS VESICULAR
SITUACION EN ARGENTINA**

II TALLER INTERNACIONAL DE
DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE FIEBRE AFTOSA

Asunción, Paraguay | 8 a 12 de mayo de 2017

DVM - MSc. Andrea PEDEMONTE

senasa

Organización Panamericana de la Salud
Organización Mundial de la Salud
Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFOSA - OPS/OMS
Servicio Público Veterinario

Situación en Argentina

1939	→ Se diagnosticó por 1º vez
1963	→ Indiana 2
1986	→ Indiana 2
1987	→ Sin casos
Desde 1987	→ Serología para Importación

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFOSA - Servicio Público Veterinario

Junio

2015

1 Establece en Pcia de Santa Fe

Animales afectados → 50 Vacas lecheras > 2 años

Síntomas y lesiones → Bovinos sólo en ubre
Lesiones en humanos

Diagnóstico Presuntivo → Mamilitis Herpética Bovina

Muestras recibidas → Epitelio, sueros, hisopados

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFOSA - Servicio Público Veterinario



DIAGNOSTICO

	Fiebre Aftosa	Estomatitis Vesicular	IBR-DVB-Lengua Azul
EPITELIO	NEGATIVO	INDIANA	NEGATIVO (Herpesvirus)
HISOPADOS	----	---	NEGATIVO
SUEROS	NEGATIVO	INDIANA	NEGATIVO

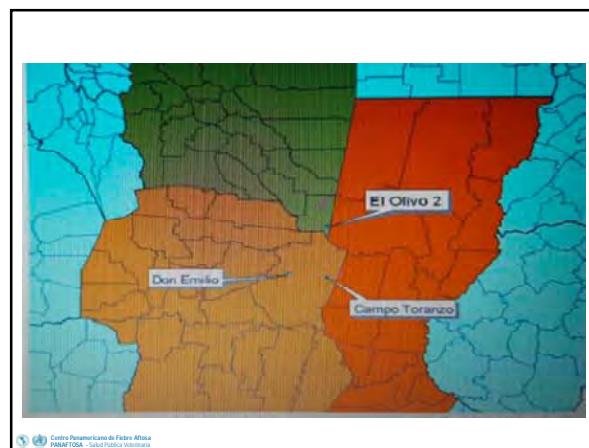
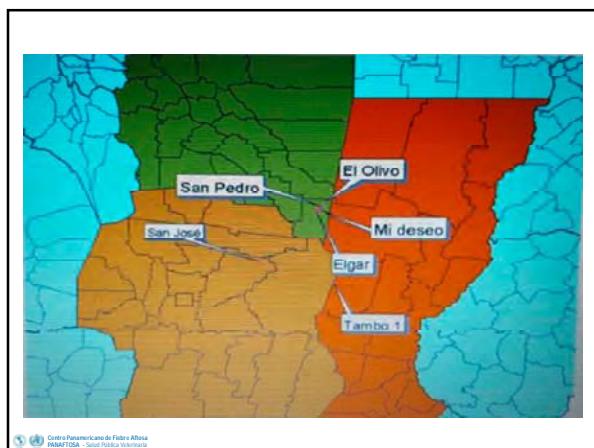
Estomatitis Vesicular	Tipificación	RT-PCR	ELISA AC	Secuenciación
Indiana	Indiana 2	Indiana	Indiana 2	

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFOSA - Servicio Público Veterinario

Julio a Septiembre	
5 Santiago del Estero	
3 Córdoba	
	
	 <p>Bovinos > 2 años Lesión en ubre</p>
Tipificación	→ TODOS POSITIVOS A INDIANA
RT- PCR	→ INDIANA 2

Resultados serológicos

- Otras especies susceptibles

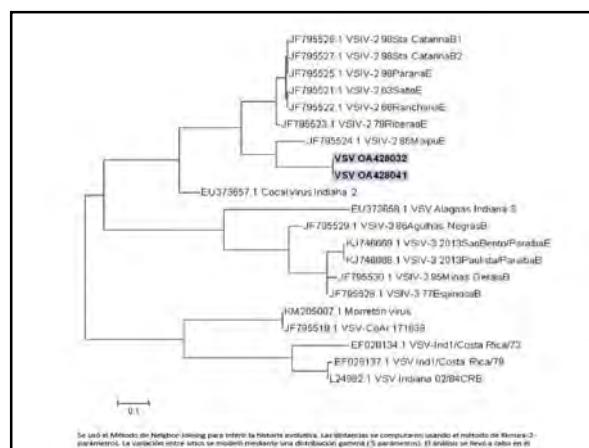


The diagram illustrates the following information:

- Junio
- 2 Santa Fe
- 1 Bs.As

Tipificación → **TODOS POSITIVOS A INDIANA**

RT - PCR → **INDIANA 2**



Investigación Epidemiológica

- Vía de ingreso?????
 - NO se detectaron movimientos de animales
 - NO hay relación con los camiones cisterna
 - NO existió uso de material reproductivo
 - NO habría existido traslado por personas
- Clima/ Hematófagos
- Estudio retrospectivo de notificaciones y sospechas

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOSA - Salud Pública Veterinaria

Muestreo Serológico

2015

- Sta Fe, Córdoba y Sgo del Estero
 - Se eligen establecimientos de los departamentos donde se detectaron los focos y departamentos linderos
 - 1300 muestras
 - Extraídas previo a los casos EV

↓

TODOS NEGATIVOS

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOSA - Salud Pública Veterinaria

Impacto en comercio internacional

Cambio de motivo de diagnóstico

↓

Implementar Seroneutralización

1500 muestras anuales → 3800 muestras

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOSA - Salud Pública Veterinaria

Actualidad

Hallazgos en las cuarentenas pre-exportación

+ Indiana 2

Cerdo	Córdoba
Bovino	Bs.As
Equino	Bs. As

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOSA - Salud Pública Veterinaria

www.paho.org/panaftosa

MUCHAS GRACIAS!

SENASA
LABORATORIO DE REFERENCIA OIE PARA FIEBRE AFTOSA
DVM. MSC Andrea Pedemonte
apedemon@senasa.gob.ar

Twitter/[panaftosa_inf](#) Facebook/[kmcPANAFTOSA](#)

**III TALLER INTERNACIONAL DE
DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE FIEBRE AFTOSA**
Asunción, Paraguay | 8 a 12 de mayo de 2017

Experiencia de Centroamérica en el diagnóstico de Estomatitis vesicular

Anarvik Sánchez Paredes
Laboratorio de Diagnóstico de Enfermedades Vesiculares (LADIVES)

Organización Panamericana de la Salud
Organización Mundial de la Salud
Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANATOSA - OIE/OMS
Salud Pública Veterinaria

Serotipo encontrado

Desde 2014 a 2016

- EV New Jersey
- EV Indiana
- Ambos

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANATOSA - Salud Pública Veterinaria

Etiología

Estomatitis Vesicular

- Orden Mononegavirales
- Familia Rhabdoviridae
- Género: *Vesiculovirus*
- Genoma RNA sentido negativo
- Tipos New Jersey
 - Indiana (Indiana 1)
 - Cocal (Indiana 2)
 - Alagoas (Indiana 3)

Diagrama del virus:

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANATOSA - Salud Pública Veterinaria

Vigilancia epidemiológica

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANATOSA - Salud Pública Veterinaria

Fundación

- 13 de septiembre de 1982
- Por iniciativa de:
 - MIDA
 - OIRSA
 - USDA

Determinar un diagnóstico rápido, oportuno y confiable de las enfermedades vesiculares, incluida la fiebre aftosa y otras enfermedades exóticas utilizando Tecnología de Punta.

Además de ser un apoyo a los Programas de Salud Animal de los países de Centroamérica y Panamá.

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANATOSA - Salud Pública Veterinaria

Toma de muestra

La toma rápida y eficaz de la muestra incluye:

- Atención inmediata al brote notificado
- La obtención correcta de la muestra y su perfecto embalaje para ser enviada a el laboratorio.

Modo de enviar muestras a el LADIVES:

- El veterinario debe llegar temprano al brote vesicular e intentar tomar muestras de lesiones frescas
- Necesitamos un epitelio con peso mayor de 1 gr. que se coloca en frascos que contienen glicerina fosfatada y tamponada; proporcionados por LADIVES.
- Las lesiones no deben haber sido tratadas con ningún desinfectante o substancia como Limón, sal, yodo, violeta genciana, etc...
- El líquido vesicular debe recolectarse sin glicerina o enviarla en la misma jeringuilla en que se obtuvo

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANATOSA - Salud Pública Veterinaria

Toma de muestras

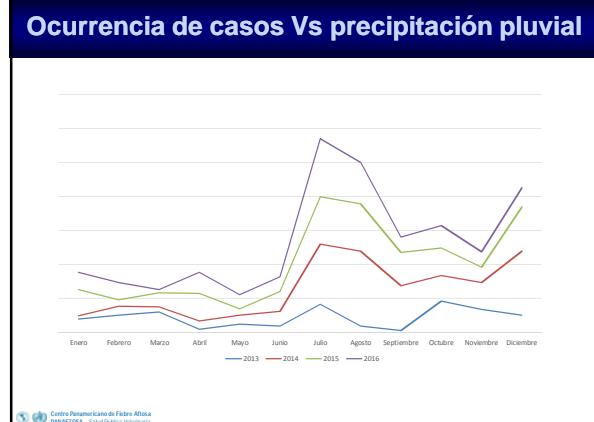
El material utilizado para la detección viral son muestras de:

Líquido vesicular

Epitelio de lesiones vesiculares en tejido mamario, podal y bucal.

Bovino con úlcera en labio Lesión en la lengua Porcino con vesícula en el hocico
Úlcera en la parte dorsal de la lengua Equino con úlcera en la lengua Equino con pérdida del epitelio de la lengua
Porcino con úlcera en la pata

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOSA - Salud Pública Veterinaria



Técnicas de diagnóstico

ELISA para la detección de antígeno

Aislamiento en cultivo celular (células VERO)

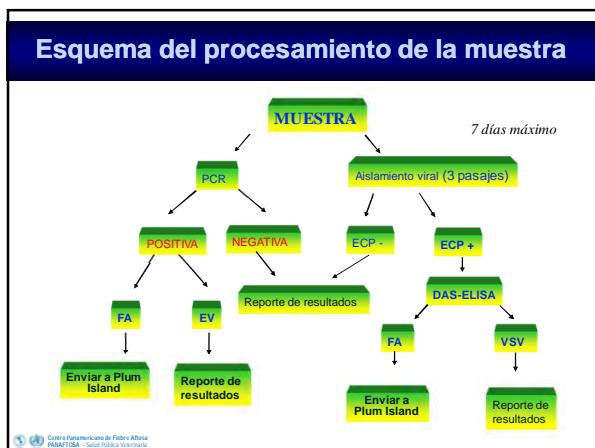
RT-PCR en tiempo real

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOSA - Salud Pública Veterinaria

Problemas encontrados

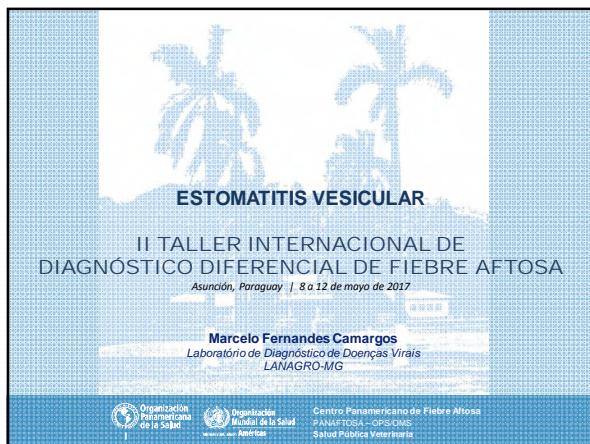
- Cantidad insuficiente de material
- Epitelio de lesiones viejas
- Muestras obtenidas después de tratamiento
- Envío de muestras en conservador inapropiado
- Tardanza en el envío de las muestras una vez obtenida
- Transporte internacional de muestras

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOSA - Salud Pública Veterinaria



www.paho.org/panaftosa

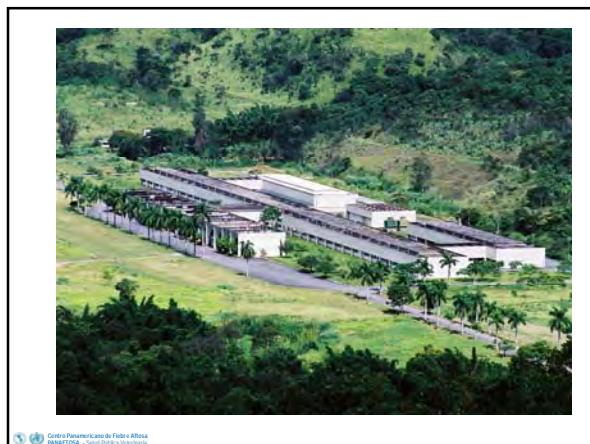
Twitter/panaftosa_inf Facebook/kmcPANAFTOSA



Ensaios acreditados ISO/IEC 17025:2005

SUSPENSÃO BACTERIANA	Mycobacterium bovis: Detecção pela técnica de PCR em tempo real.	MET/LBM/PL/015 - V.3
SANGUE E AMÍGDALA SUINO	Detectão do vírus causador da Peste suína clássica por PCR em tempo real.	MET/LBM/PL/019 - V.2
LÍQUIDO ESOFAGICO/FARINGEO – LEF E TECIDO ANIMAL	Identificação molecular do vírus da Febre Aftosa.	MET/LBM/PL/023 V.2
TECIDO ANIMAL	Identificação molecular do Mycobacterium bovis ou Micobactérias do Complexo M. Tuberculosis.	MET/LBM/PL/034 V.3

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOZA - Centro de Referência



Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOZA - Centro de Referência

Ensaios acreditados ISO/IEC 17025:2005

SCOPO DA ACREDITAÇÃO - ABNT NBR ISO/IEC 17025 - ENSAIO		
Norma de Referência: NBR-CLACLA-616	Folha: 19	Total de Folhas: 20
Nº do Registro: CRL 0356	TIPO DE INSTALAÇÃO:	
ÁREA DE ATIVIDADE / SUB-ÁREA:	INSTALAÇÃO PERMANENTE	
SAÚDE ANIMAL	CLASSE DE ENSAIO / DESCRIÇÃO DO ENSAIO	NORMA E/OU PROCEDIMENTO
	ENSAIOS BIOLÓGICOS	
TECIDO ANIMAL	Identificação molecular do VS/3, vírus causador da Estomatite Vesicular por PCR em tempo real.	MET/LBM/PL/020 V.2
	Identificação molecular do VS/3, vírus causador da Estomatite Vesicular por PCR em tempo real.	MET/LBM/PL/033 V.2
SORO SANGUÍNEO DE EQUÍDEOS	Ensaios de imunoabsorção em gel de agar para identificação de Anemia Infectiosa Equina.	MET/LDDV/PL/004 - V.9
SORO SANGUÍNEO DE SUÍDEOS	Determinação qualitativa de anticorpos para os soroparás de competição em fase líquida.	MET/LDDV/PL/006 - V.9
	Titulação de anticorpos estruturais do vírus da Febre Aftosa (Título): de 0,3 a 3,8.	MET/LDDV/PL/017 - V.4
	Neutralização para o Herpes Virus Bovino 1.	MET/LDDV/PL/003 - V.6
	Detectão de anticorpos para o vírus da Chlamídia Bovina a Vírus pela técnica de neutralização viral.	MET/LDDV/PL/002 - V.5
SORO SANGUÍNEO DE SUÍDEOS	Determinação qualitativa de anticorpos para o vírus da Chlamídia Cisticola (PSC) pela técnica de ELISA.	MET/LDDV/PL/008 - V.5
	Detectação de anticorpos para o vírus da Peste Suína (PSA) pela técnica de ELISA.	MET/LDDV/PL/020 - V.2
SORO SANGUÍNEO DE BOVÍDEOS, EQUÍDEOS, SUÍDEOS, OVINOS E SUÍDEOS	Detectação de anticorpos para o vírus da Estomatite Vesicular pela técnica de neutralização viral.	MET/LDDV/PL/023 - V.6
	Detectão de anticorpos para a proteína não estrutural SARC do vírus da Fiebre Aftosa por ELISA (Prionics).	MET/LDDV/PL/029 - V.3

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOZA - Centro de Referência

LDDV – Laboratorio de Diagnóstico de Doenças Virais LBM – Laboratorio de Biologia Molecular

Apoio aos programas de saúde animal

- Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos
- Programa Nacional de Sanidade dos Suídeos
- PNEFA

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOZA - Centro de Referência

Diagnóstico laboratorial

- Confirmação do diagnóstico clínico
- Não substitui o diagnóstico clínico
- A qualidade do diagnóstico depende da seleção e qualidade das amostras

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOZA - Centro de Referência

Estomatite vesicular

 Centro Panamericano de Febre Aftosa
CPFA/FAO - Saúde Pública Veterinária

Estomatite vesicular



 Centro Panamericano de Febre Aftosa
CPFA/FAO - Saúde Pública Veterinária

Estomatite vesicular

- Diagnóstico clínico (FORM-IN)
- Temperatura > 40º C;
- Salivação excessiva;
- Vesículas na língua, lábios, na comissura da boca e gengiva (equídeos), palato duro, focinho e narina.
- Desprendimento do epitélio
- Lesões cicatrizadas

 Centro Panamericano de Febre Aftosa
CPFA/FAO - Saúde Pública Veterinária

Estomatite vesicular



 Centro Panamericano de Febre Aftosa
CPFA/FAO - Saúde Pública Veterinária

Estomatite vesicular

- Diagnóstico clínico (FORM-IN)
- Lesões erosivas na gengiva e língua;
- Feridas no espaço interdigital e coroa do casco;

 Centro Panamericano de Febre Aftosa
CPFA/FAO - Saúde Pública Veterinária

Estomatite vesicular



 Centro Panamericano de Febre Aftosa
CPFA/FAO - Saúde Pública Veterinária

Estomatite vesicular



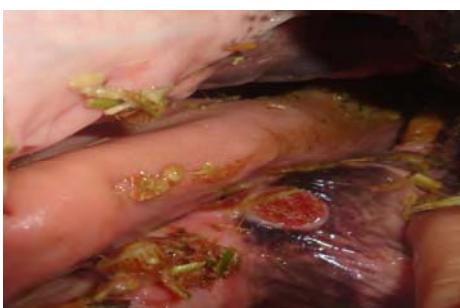
Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFOSA - Saúde Pública Veterinária

Estomatite vesicular



Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFOSA - Saúde Pública Veterinária

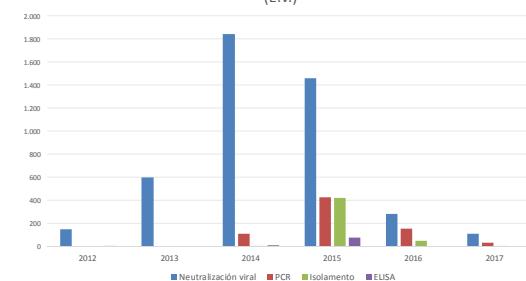
Estomatite vesicular



Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFOSA - Saúde Pública Veterinária

Estomatite vesicular

Número de amostras processadas por ano e tipo de ensaio
(E.V.)



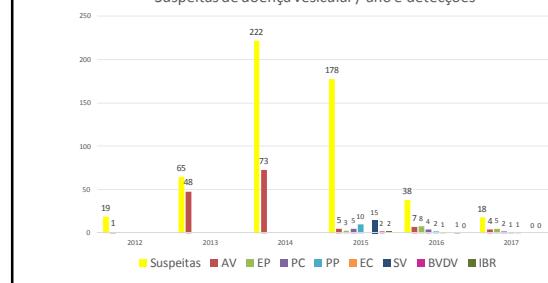
Estomatite vesicular



Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFOSA - Saúde Pública Veterinária

Estomatite vesicular

Suspeitas de doença vesicular / ano e detecções



Estomatite vesicular

- Diagnóstico laboratorial
- Amostras recebidas: epitélio, suave, líquido vesicular e soro
- Inativação de amostras
- Isolamento de vírus em células BHK
- Neutralização viral – Estomatite Vesicular

 Centro Panamericano de Febre Amarela
PNAFTOSA - Saúde Pública Veterinária

ELISA SI

- Panaftosa;
- Uso eventual;
- Identificação IV / NJ;
- Sensibilidade analítica.

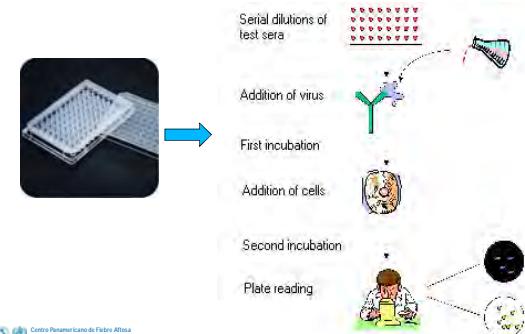
 Centro Panamericano de Febre Amarela
PNAFTOSA - Saúde Pública Veterinária

Isolamento de vírus



 Centro Panamericano de Febre Amarela
PNAFTOSA - Saúde Pública Veterinária

Neutralização viral



 Centro Panamericano de Febre Amarela
PNAFTOSA - Saúde Pública Veterinária

Estomatite vesicular

- Isolamento de vírus: variações nos protocolos
- Número de passagens;
- Tipo de garrafa ou placa;
- Tempo de incubação pós-inoculação;
- Processamento após passagens;
- Células em suspensão ou monocamada;
- Tempo de incubação do inóculo;

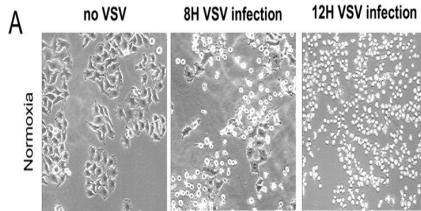
 Centro Panamericano de Febre Amarela
PNAFTOSA - Saúde Pública Veterinária

Neutralização viral

- Inativação dos soros 30 min./56 °C;
- Diluição inicial 1/20 (100 µL) em base 2 em duplicata – 2 colunas da microplaca;
- 100 TCID₅₀/100 µL – AV, CV, IV (sugestão PNEFA); **Qual isolado utilizar?**
- 900.000 células VERO em suspensão (50 µL);
- **30 a 300 TCID₅₀**;
- Soros controle;
- Manual OIE 2 protocolos: vírus, diluição inicial, ponto de corte, leitura

 Centro Panamericano de Febre Amarela
PNAFTOSA - Saúde Pública Veterinária

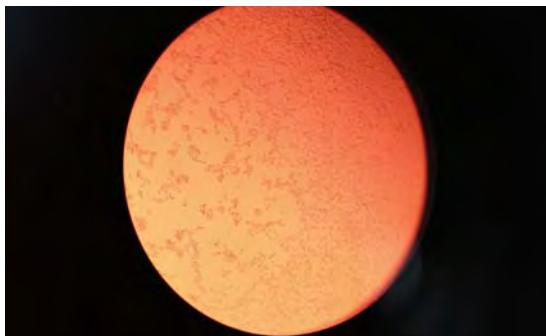
Avaliação do efeito citopático



Fonte: John H. Connor et al. J. Virol. 2004;78:8960-8970

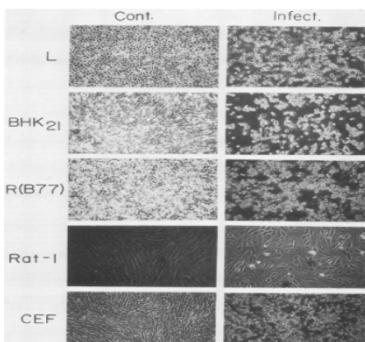
Centro Panamericano de Febre Amarela
PAFFA - São Paulo - Brasil

Avaliação do efeito citopático



Centro Panamericano de Febre Amarela
PAFFA - São Paulo - Brasil

Avaliação do efeito citopático



Fonte: JOURNAL OF VIROLOGY, Feb. 1985, p. 374-383 Vol. 53, No. 2

Centro Panamericano de Febre Amarela
PAFFA - São Paulo - Brasil

Resultados neutralização Bovinos

Amostra	IV			CV			AV		
	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3
Bovino									
1-Faz1	1,6	<1,3	1,6	<1,3	1,3	<1,3	<1,3	2,5	2,8
2-Faz1	<1,3	<1,3	1,3	1,6	2,5	2,2	4,0	3,1	3,1
3-Faz1	1,6	<1,3	1,6	1,6	1,9	2,2	3,1	2,8	3,1
4-Faz1	1,3	<1,3	1,2	<1,3	1,3	<1,3	1,3	3,1	2,8
5-Faz1	1,9	1,3	1,3	1,9	1,2	<1,3	3,4	3,4	2,8
6-Faz1	2,2	1,3	1,9	1,6	1,6	1,6	3,1	3,1	3,1
1-Faz2	1,3	1,3	*	2,2	1,9	*	4,3	3,7	*
2-Faz2	1,9	2,2	*	2,5	2,2	*	3,7	2,8	*
3-Faz2	1,3	1,3	*	1,9	1,9	*	3,1	3,1	*
4-Faz2	1,3	1,3	*	1,9	2,2	*	3,7	3,1	*
5-Faz2	1,6	1,3	*	2,5	2,5	*	3,4	3,1	*
6-Faz2	1,9	1,9	*	2,5	2,2	*	3,7	3,7	*
7-Faz2	1,9	2,5	*	2,5	2,5	*	3,1	4,3	*
8-Faz2	1,9	2,2	*	3,1	2,5	*	3,7	3,1	*
9-Faz2	2,2	1,9	*	2,2	1,9	*	3,4	3,1	*
10-Faz2	1,9	2,2	*	2,2	2,2	*	3,7	4	*
11-Faz2	1,9	<1,3	*	1,6	<1,3	*	3,1	2,8	*
1-Faz3	1,6	1,9	*	1,6	2,6	*	3,1	3,1	*
2-Faz3	2,5	1,9	*	2,8	2,8	*	4,6	4,0	*
Média	1,8	1,8	1,5	2,2	2,0	2,0	3,4	3,2	3,0

C1, C2 e C3: coletas realizadas; *Não realizado.

SOROCONVERSÃO

Avaliação do efeito citopático



Centro Panamericano de Febre Amarela
PAFFA - São Paulo - Brasil

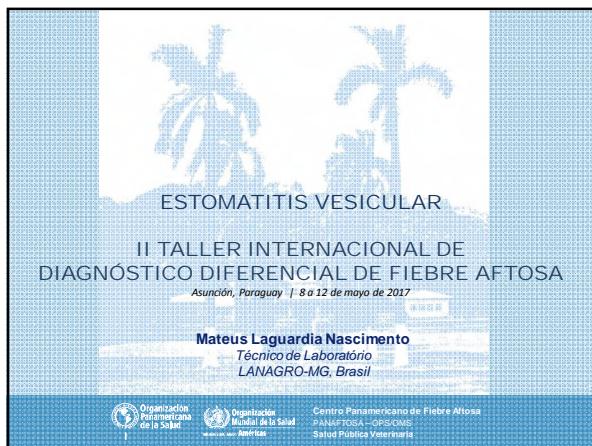
Resultados neutralização Equinos

Amostra	IV			CV			AV		
	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3
Equino									
1-Faz1	2,8	2,5	1,6	2,8	2,2	1,9	4,9	3,7	3,4
2-Faz1	2,8	2,5	1,3	2,5	1,9	1,3	4,3	3,7	3,1
3-Faz1	2,2	1,9	1,6	2,5	1,9	1,6	4,0	3,1	3,4
Média	2,6	2,3	1,5	2,6	2,0	1,6	4,4	3,5	3,3

Suínos

Amostra	IV			CV			AV		
	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3
Suíno									
1-Faz1	<1,3			2,8			4,9		
2-Faz1	<1,3			2,5			4,3		
3-Faz1	<1,3			2,5			4,0		

Centro Panamericano de Febre Amarela
PAFFA - São Paulo - Brasil



Estomatite Vesicular

- Vesiculovirus:
 - Diagnóstico diferencial de Febre Aftosa
- Prevalência no Brasil:
 - Apenas Cocal e Alagoas
 - Indiana e New Jersey ainda não foram detectados

Estomatite Vesicular

- Indiana e New Jersey Vesiculovirus:
 - RT-PCR Convencional
 - Regiões amplificadas:
 - Indiana: Nucleocapsídeo
 - New Jersey: Fosfoproteína
 - Achados no Brasil:
 - Nunca foram relatados no Brasil

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOZA - Salud Pública Veterinaria

Estomatite Vesicular

- Cocal Vesiculovirus:
 - RT-qPCR
 - Região amplificada: Glicoproteína
 - Quase 20 anos sem achados no Brasil

Estomatite Vesicular

- Alagoas Vesiculovirus:
 - RT-qPCR triplex
 - Regiões amplificadas: Glicoproteína, nos três casos
 - Surtos recentes, especialmente na região Nordeste

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOZA - Salud Pública Veterinaria

Estomatite Vesicular

- Vesiculovirus:
 - Trabalhos acadêmicos desenvolvidos no LBM:
 - “Alagoas Vesiculovirus – Validação de reação em cadeia da polymerase (RT-qPCR) e análise filogenética” (OLIVEIRA, A. M. 2017. Universidade de Brasília)

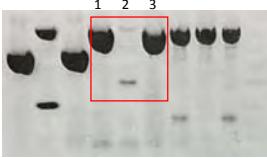
Estomatite Vesicular

- Alagoas Vesiculovirus

- Maior dificuldade: Variabilidade
 - Vírus isolados que não eram detectados em PCR!
 - Atualmente usamos três pares de iniciadores diferentes para detectar este vírus.
 - PCR convencional: Eficiente na amplificação dos três grupos, porém com *amplicons* grandes.
 - Região amplificada: Fosfoproteína
 - Confirmação por sequenciamento.

 Centro Panamericano de Febre Amarela
PAFFA - Fundação Oswaldo Cruz

Estomatite Vesicular

- 
- Custodia ("Grupo B")
 - Alagoas ("Grupo A")
 - Aguilhas Negras ("Grupo C")

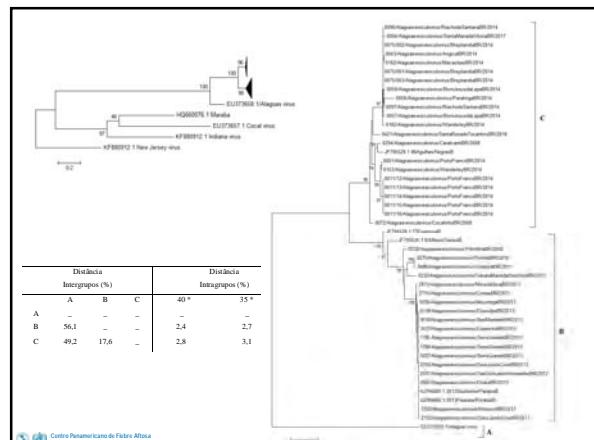
 Centro Panamericano de Febre Amarela
PAFFA - Fundação Oswaldo Cruz

Estomatite Vesicular

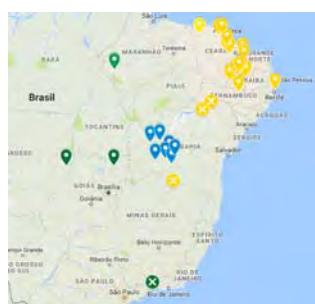
- Alagoas Vesiculovirus:

- Muita divergência filogenética
- Poucas regiões de alinhamento entre os vírus

 Centro Panamericano de Febre Amarela
PAFFA - Fundação Oswaldo Cruz



Estomatite Vesicular



 Centro Panamericano de Febre Amarela
PAFFA - Fundação Oswaldo Cruz

Estomatite Vesicular



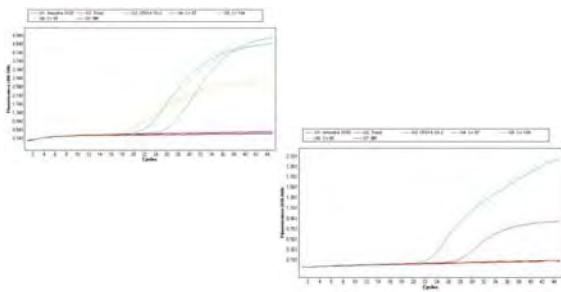
 Centro Panamericano de Febre Amarela
PAFFA - Fundação Oswaldo Cruz

Estomatite Vesicular

- Alagoas Vesiculovirus:
 - Poucas regiões de alinhamento entre os virus
 - Novos iniciadores desenhados usando como molde as sequências obtidas a partir dos isolados amplificados em PCR convencional e dos bancos de dados internacionais.
 - PCR Triplex desenvolvida *in house*

 Centro Panamericano de Física Atômica
CENPAFTOSA - Instituto Federal de Alagoas

Estomatite Vesicular



www.paho.org/panaftosa



mateus.nascimento@agricultura.gov.br
mateuslaguardia@gmail.com

[Twitter/panaftosa_inf](#) [Facebook/kmcPANAFTOSA](#)

SENECAVIRUS

Experiencia en Diagnóstico del Virus del Valle del Seneca (SVA)

II TALLER INTERNACIONAL DE DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE FIEBRE AFTOSA
Asunción, Paraguay | 8 a 12 de mayo de 2017

Consuelo Carrillo
Senior Animal Health Advisor
DSS-FADDL-STATS-VS-NVSL
APHIS-USDA

Organización Panamericana de la Salud
Organización Mundial de la Salud
Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOZA - OPS/OMS
Salud Pública Veterinaria

Seneca Valley Virus A

- Experiencia en US
 - Generalidades
 - Detección clínica y derivación de los casos
- Diagnóstico
 - Muestras clínicas
 - Pruebas de laboratorio
 - Ejemplos de casos clínicos
 - Problemas/soluciones
- Literatura de interés

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOZA - Salud Pública Veterinaria

USDA

Seneca Valley Virus A

- Experiencia en US
 - Generalidades
 - Detección clínica y derivación de los casos
- Diagnóstico
 - Muestras clínicas
 - Pruebas de laboratorio
 - Ejemplos de casos clínicos
 - Problemas/soluciones
- Literatura de interés

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOZA - Salud Pública Veterinaria

USDA

Epidemiología

- Reportada como enfermedad vesicular idiopática en:
 - Nueva Zelanda
 - Australia
 - Brasil
 - Canadá
 - EEUU

- Reproducción experimental de la enfermedad con SVA
- Reservorios naturales y mecanismos de transmisión desconocidos
- Impacto económico en aumento

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOZA - Salud Pública Veterinaria

USDA

SVA Generalidades

- La primera descripción del virus se registró en 1988, conocida como enfermedad vesicular idiopática del cerdo
- El primer aislamiento del agente data del 2002 (SVV-001)
 - Picornavirus oncolítico que lisa células tumorales de estirpe neuroendocrina
 - La secuencia completa se obtuvo en 2005 (Knowles and Hallenbeck)

Fig. 1. P1 aa Neighbor-Joining tree, 1000 bootstrap, pseudo-replicates.

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOZA - Salud Pública Veterinaria

USDA

SVA Generalidades

- La primera descripción del virus se registró en 1988, conocida como enfermedad vesicular idiopática del cerdo
- El primer aislamiento del agente data del 2002 (SVV-001)
 - Picornavirus oncolítico que lisa células tumorales de estirpe neuroendocrina
 - La secuencia completa se obtuvo en 2005 (Knowles and Hallenbeck)

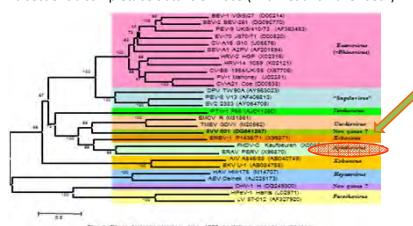
Fig. 1. P1 aa Neighbor-Joining tree, 1000 bootstrap, pseudo-replicates.

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOZA - Salud Pública Veterinaria

USDA

SVA Generalidades

- La primera descripción del virus se registró en 1988, conocida como enfermedad vesicular idiopática del cerdo
- El primer aislamiento del agente data del 2002 (SVV-001)
 - Picornavirus oncolítico que lisa células tumorales de estirpe neuroendocrina
 - La secuencia completa se obtuvo en 2005 (Knowles and Hallenbeck)

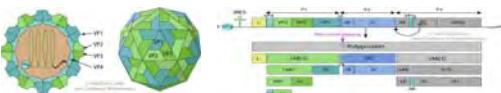


Centro Panamericano de Fiebre Aflaca
PANAFTOZA - Salud Pública Veterinaria

Ministerio de Recursos Naturales y Ambiente
Banco Mundial para la Desarrollo Rural
Programa de Desarrollo Rural



La Partícula Viral



❖ Genoma completo del SVV-001: Picornavirus

❖ Primer estudio filogenético de VP1 y región 3'-terminal:

- Cercano a los cardiovirus pero bien diferenciado como un solo grupo
- Nuevo Genero: Seneca virus
- Única Especie: Seneca Valley Virus (SVV, SVA)
- Virus prototipo: SVV-001

❖ Primer estudio serológico:

- Detección de anticuerpos en bovinos, porcinos y ratones
- Completa neutralización cruzada entre aislados

Inmunidad

- No hay vacunas
- Anticuerpos Sero-neutralizantes

Serum Source	Total no. of animals tested	No. with neutralizing antibodies	%age with neutralizing antibodies	Neutralization titre
Pigs	71	27	38%	1:4
Pigs (from disease-free farm)	30	4	13%	1:4
Cows	30	10	33%	1:8
Mice	35	5	14%	1:2

* Antisera from farm animals were tested in a neutralization assay with SVV-001 (Knowles et al. 2006)

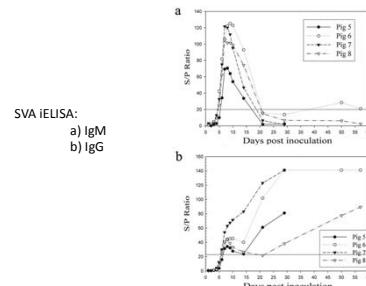
Centro Panamericano de Fiebre Aflaca
PANAFTOZA - Salud Pública Veterinaria

Ministerio de Recursos Naturales y Ambiente
Banco Mundial para la Desarrollo Rural
Programa de Desarrollo Rural



Respuesta Inmune a la Infección Experimental

- Anticuerpos a los 6 DPI hasta 60 o más DPI (Yang et al. 2012)



Centro Panamericano de Fiebre Aflaca
PANAFTOZA - Salud Pública Veterinaria

Ministerio de Recursos Naturales y Ambiente
Banco Mundial para la Desarrollo Rural
Programa de Desarrollo Rural



Síntomas

- Letargia
- Fiebre
- Inapetencia
- Cojera y claudicación
- Vesículas en:
 - Morro (jeta y boca)
 - Banda coronaria
 - Pezones
- Mortalidad 30-70% en lechones de menos de 7 días de edad



Centro Panamericano de Fiebre Aflaca
PANAFTOZA - Salud Pública Veterinaria

Ministerio de Recursos Naturales y Ambiente
Banco Mundial para la Desarrollo Rural
Programa de Desarrollo Rural

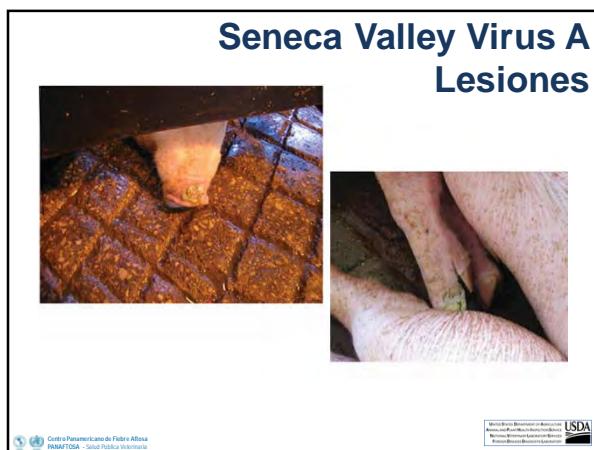


Seneca Valley Virus A Lesiones



Ministerio de Recursos Naturales y Ambiente
Banco Mundial para la Desarrollo Rural
Programa de Desarrollo Rural





Seneca Valley Virus A

- Experiencia en US
 - Generalidades
 - Detección clínica y derivación de los casos
- Diagnóstico
 - Muestras clínicas
 - Pruebas de laboratorio
 - Ejemplos de casos clínicos
 - Problemas/soluciones
- Literatura de interés

Centro Panamericano de Fiebre Aflaca
PANAFOSA - Salud Pública Veterinaria

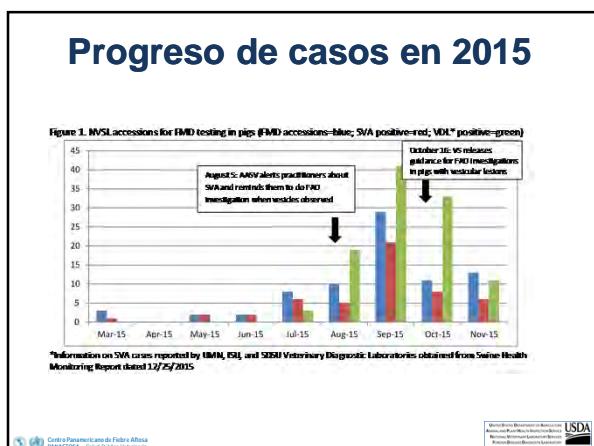
USDA
United States Department of Agriculture
Servicio de Inspección Sanitaria
Federado de Estados Unidos

Clínica Veterinaria

- Hasta 2007 muy pocos casos similares a FMDV
- Todos considerados Prioridad 1A
- Todos demostraron ser negativos a FMDV, VSV, SVDV y VESV.
- Aislamiento viral fue positivo
- Microscopía electrónica sugirió un Picornavirus
- PCR y secuenciación demostraron la presencia de SVA

Centro Panamericano de Fiebre Aflaca
PANAFOSA - Salud Pública Veterinaria

USDA
United States Department of Agriculture
Servicio de Inspección Sanitaria
Federado de Estados Unidos



Derivación de casos

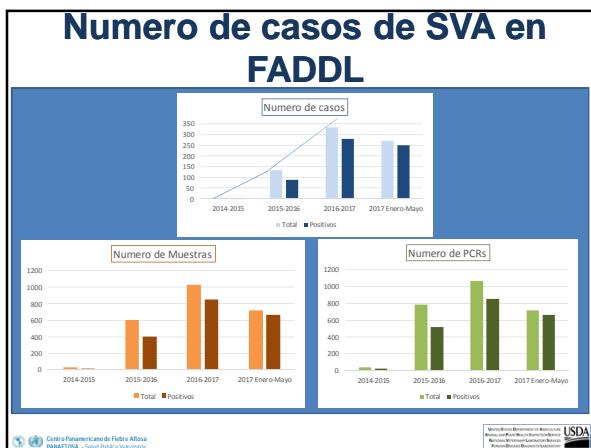
Las muestras se envían por duplicado a FADDL y al Laboratorio no Federal

Necesario demostrar inicialmente que son negativas a FMDV, VSV, SVDV y VESV

- Universidades de Veterinaria con Laboratorio de diagnóstico
- Red Nacional de Laboratorios Estatales (NLAHN)
 - Identificación de Antígeno específico:
 - ❖ aislamiento viral
 - ❖ Inmuno histquímica
 - ❖ RT-PCR y rRT-PCR
 - ❖ secuenciación
 - Identificación de Anticuerpos específicos:
 - ❖ iELISA
 - ❖ cELISA
 - ❖ Sero neutralización
 - ❖ IFI-IPx en células infectadas

Centro Panamericano de Fiebre Aflaca
PANAFOSA - Salud Pública Veterinaria

USDA
United States Department of Agriculture
Servicio de Inspección Sanitaria
Federado de Estados Unidos



Definición de caso

La enfermedad no es reportable pero es mandatorio alertar a las autoridades sanitarias nacionales para la inmediata exclusión de enfermedades vesiculares de declaración obligatoria

**Centro Panamericano de Fiebre Aflosa
PANAFOSA - Salud Pública Veterinaria**

Definición de caso

Caso sospechoso:

enfermedad vesicular que no corresponde a ninguna de las vesiculares diferenciales reportables

Caso positivo presuntivo:

un caso con historia de contacto con animal/es que han sido confirmados positivos para SVAD

Caso positivo confirmado:

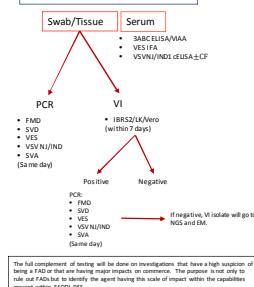
Un animal que da resultado positivo a la detección del SVAD y presenta síntomas consistentes con la enfermedad y que da resultado negativo a la detección de las diferenciales reportables

**Centro Panamericano de Fiebre Aflosa
PANAFOSA - Salud Pública Veterinaria**

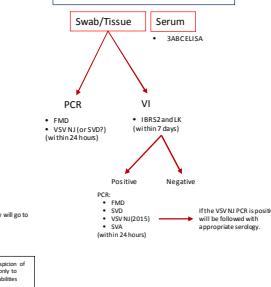
USDA

Algoritmo Diagnóstico

Prioridad 1/A



Prioridad 2/3



Seneca Valley Virus A

- Experiencia en US
 - Generalidades
 - Detección clínica y derivación de los casos
- Diagnóstico
 - Muestras clínicas
 - Pruebas de laboratorio
 - Ejemplos de casos clínicos
 - Problemas/soluciones
- Literatura de interés

**Centro Panamericano de Fiebre Aflosa
PANAFOSA - Salud Pública Veterinaria**

USDA

Muestras para Diagnóstico de SVA

Muestras recomendadas:

- fluido vesicular
- epitelio vesicular
- hisopado de la lesión cutánea
- Suero

Muestras alternativas:

- Ganglios linfáticos
- Amígdalas
- Intestino
- Heces
- Bazo, riñón, pulmones y corazón
- Cerebro y medula espinal

**Centro Panamericano de Fiebre Aflosa
PANAFOSA - Salud Pública Veterinaria**

USDA

Diagnóstico de SVA

Diagnóstico clínico: Enfermedad Vesicular Idiopática y/o mortalidad de lechones

Diagnóstico virológico diferencial
en adultos, con: VSV, VES, SVD y FMDV
en lechones, con: PED, PDCo, TGE, PRRS y Rotavirus

Diagnóstico bacteriano diferencial
E. Coli
Clostridium

Diagnóstico de laboratorio

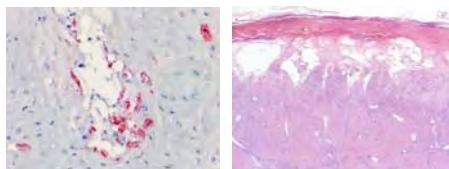
- Identificación de Anticuerpos específicos
 - ❖ iELISA
 - ❖ cELISA
 - ❖ Sero Neutralización
 - ❖ IFI-IPx en células infectadas
- Identificación del Agente infeccioso
 - ❖ Inmuno histocímica
 - ❖ Aislamiento viral
 - ❖ RT-PCR y rRT-PCR
 - ❖ Secuenciación

 Centro Panamericano de Fiebre Aflosa
CIPAFOSA - Salud Pública Veterinaria
 Servicio de Inspección y Aduana
Agencia Federal de Medicina Veterinaria
Servicio de Inspección y Aduana

Histopatología e Immuno Histoquímica

Vasculitis linfo-histocítica adventicia sistémica

Señal positiva en tonsilas durante 4-8 semanas en cerdos adultos sin síntomas visibles



 Centro Panamericano de Fiebre Aflosa
CIPAFOSA - Salud Pública Veterinaria
 Servicio de Inspección y Aduana
Agencia Federal de Medicina Veterinaria
Servicio de Inspección y Aduana

Diagnóstico de SVA

Diagnóstico clínico: Enfermedad Vesicular Idiopática y/o mortalidad de lechones

Diagnóstico virológico diferencial
en adultos, con: VSV, VES, SVD y FMDV
en lechones, con: PED, PDCo, TGE, PRRS y Rotavirus

Diagnóstico bacteriano diferencial
E. Coli
Clostridium

Diagnóstico de laboratorio

- Identificación de Anticuerpos específicos
 - ❖ iELISA
 - ❖ cELISA
 - ❖ Sero Neutralización
 - ❖ IFI-IPx en células infectadas
- Identificación del Agente infeccioso
 - ❖ Inmuno histocímica
 - ❖ Aislamiento viral
 - ❖ RT-PCR y rRT-PCR
 - ❖ Secuenciación

 Centro Panamericano de Fiebre Aflosa
CIPAFOSA - Salud Pública Veterinaria
 Servicio de Inspección y Aduana
Agencia Federal de Medicina Veterinaria
Servicio de Inspección y Aduana

Aislamiento de SVA en cultivos celulares

➤ Efecto Citopático:

- Swine Testis (ST)
- Swine Kidney (SK-RST)
- Cáncer Humano de pulmón (NCI-H1299)
- Retinoblastoma humano (PER.C6)
- PK-15
- SK-6
- IBRS-2

 Centro Panamericano de Fiebre Aflosa
CIPAFOSA - Salud Pública Veterinaria
 Servicio de Inspección y Aduana
Agencia Federal de Medicina Veterinaria
Servicio de Inspección y Aduana

Diagnóstico de SVA

Diagnóstico clínico: Enfermedad Vesicular Idiopática y/o mortalidad de lechones

Diagnóstico virológico diferencial
en adultos, con: VSV, VES, SVD y FMDV
en lechones, con: PED, PDCo, TGE, PRRS y Rotavirus

Diagnóstico bacteriano diferencial
E. Coli
Clostridium

Diagnóstico de laboratorio

- Identificación de Anticuerpos específicos
 - ❖ iELISA
 - ❖ cELISA
 - ❖ Sero Neutralización
 - ❖ IFI-IPx en células infectadas
- Identificación del Agente infeccioso
 - ❖ Inmuno histocímica
 - ❖ Aislamiento viral
 - ❖ RT-PCR y rRT-PCR
 - ❖ Secuenciación

 Centro Panamericano de Fiebre Aflosa
CIPAFOSA - Salud Pública Veterinaria
 Servicio de Inspección y Aduana
Agencia Federal de Medicina Veterinaria
Servicio de Inspección y Aduana

RT-PCR convencional

1. 2006 Knowles et al. Europic
 - VP1 Amplicon de 983 pb
2. Leme et al. 2015, Brazil
 - VP3/VP1 Amplicon de 542 pb

- Por ser casos de alta prioridad suelen estar relacionados con cuarentena y lucro cesante
- FADDL desarrolló un RT-PCR de tiempo real
- Otros rRT-PCRs en uso
- Comparación de sensibilidad y especificidad

 Centro Panamericano de Fiebre Aflosa
CIPAFOSA - Salud Pública Veterinaria
 Servicio de Inspección y Aduana
Agencia Federal de Medicina Veterinaria
Servicio de Inspección y Aduana

5

rRT-PCR Comparación

Assay	Bracht et al. (FADDL)
Proteína diana	VP1
Especificidad	Curva de fusión
Química	SYBR Green
Control de amplificación	B-Actina Interno Tubo separado

Centro Panamericano de Fiebre Aflosa
PANAFTOZA - Salud Pública Veterinaria

Área de Bioseguridad Avanzada
Avances en la Bioseguridad
Panamericana y Latinoamericana
USDA

rRT-PCR Comparación

Assay	Bracht et al. (PIADC)	Zhang et al. (UoI)
Proteína diana	VP1	5' UTR
Especificidad	Curva de fusión	FAM
Química	SYBR Green	Tradicional
Control de amplificación	B-Actina Interno Tubo separado	XENO Externo Único tubo

Centro Panamericano de Fiebre Aflosa
PANAFTOZA - Salud Pública Veterinaria

Área de Bioseguridad Avanzada
Avances en la Bioseguridad
Panamericana y Latinoamericana
USDA

rRT-PCR Comparación

Assay	Bracht et al. (PIADC)	Zhang et al. (UoI)	Marthaler et al. (UoM)
Proteína diana	VP1	5' UTR	2C
Especificidad	Curva de fusión	FAM	FAM-ZEN
Química	SYBR Green	Tradicional	Doble acolchado
Control de amplificación	B-Actina Interno Tubo separado	XENO Externo Único tubo	Qiagen IC-RNA Externo Único tubo

the [ZEN Double-Quenched Probe Overview](#).

Centro Panamericano de Fiebre Aflosa
PANAFTOZA - Salud Pública Veterinaria

Área de Bioseguridad Avanzada
Avances en la Bioseguridad
Panamericana y Latinoamericana
USDA

rRT-PCR Comparación

Assay	Bracht et al. (PIADC)	Zhang et al. (UoI)	Marthaler et al. (UoM)
Proteína diana	VP1	5' UTR	2C
Especificidad	Curva de fusión	FAM	FAM-ZEN
Química	SYBR Green	Tradicional	Doble acolchado
Control de amplificación	B-Actina Interno Tubo separado	XENO Externo Único tubo	Qiagen IC-RNA Externo Único tubo

Tetracore y Pirbright real time RT-PCR

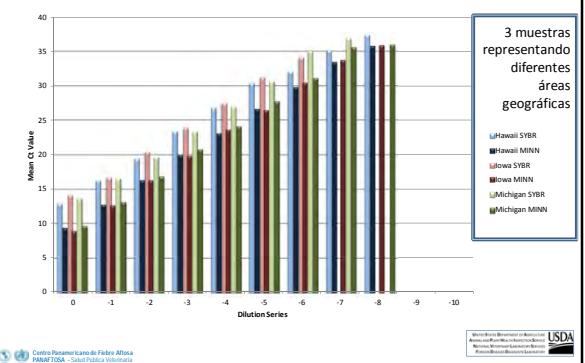
rRT-PCR Resultados de la Comparación

- FADDL's SYBR Green (Bracht et al.)**
 - Requiere el uso de una "curva" y un "rango" de fusión
 - El tiempo de ciclado es de 90 minutos
 - El costo aproximado es de \$3/reacción
- Minnesota FAST (Marthaler et al.)**
 - Usa un sistema de silenciadores doble en la sonda
 - El tiempo de ciclado es solo 33 minutos
 - El costo aproximado es de \$2/reacción
- Tetracore**
 - Tiempo de ciclado de 80 minutes
 - Tetracore es una marca registrada
 - Costo aproximado es de \$7/reacción

Centro Panamericano de Fiebre Aflosa
PANAFTOZA - Salud Pública Veterinaria

Área de Bioseguridad Avanzada
Avances en la Bioseguridad
Panamericana y Latinoamericana
USDA

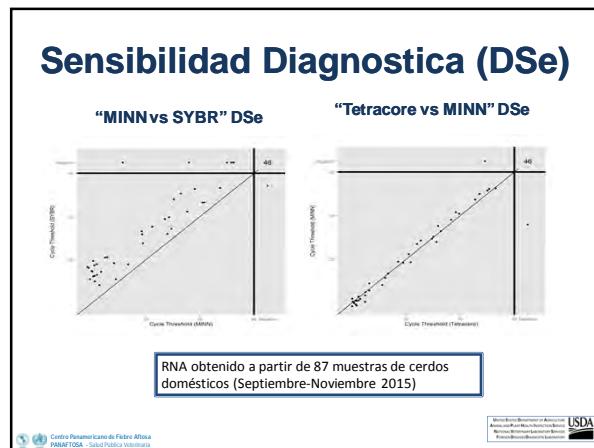
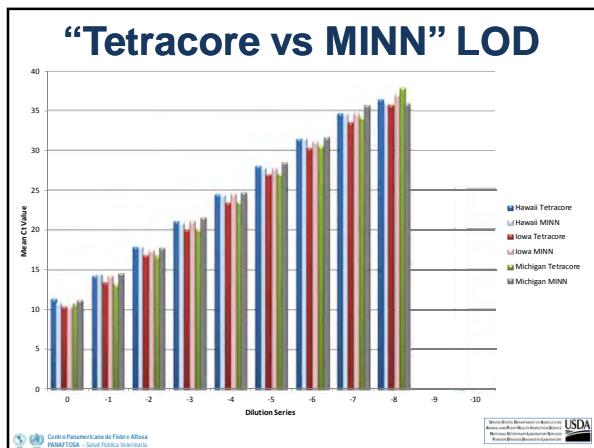
LOD “SYBR vs MINN”



3 muestras representando diferentes áreas geográficas

- Hawaii SYBR
- Hawaii MINN
- Illinois SYBR
- Illinois MINN
- Michigan SYBR
- Michigan MINN

Centro Panamericano de Fiebre Aflosa
PANAFTOZA - Salud Pública Veterinaria



Sensibilidad y Especificidad

SYBR GREEN	MINNESOTA	TETRACORE
86.6% Sensibilidad 100% Especificidad	100% Sensibilidad 98% Especificidad	100% Sensibilidad 98% Especificidad

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFOSA - Salud Pública Veterinaria

USDA

Diagnóstico de SVA

Diagnóstico clínico: Enfermedad Vesicular Idiopática y/o mortalidad de lechones

Diagnóstico virológico diferencial en adultos, con: VSV, VES, SVD y FMDV en lechones, con: PED, PDCo, TGE, PRRS y Rotavirus

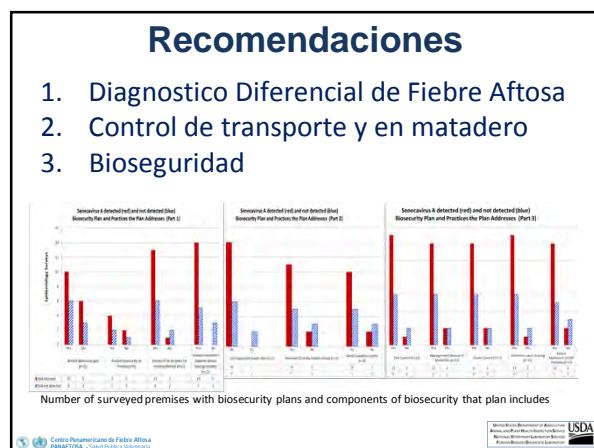
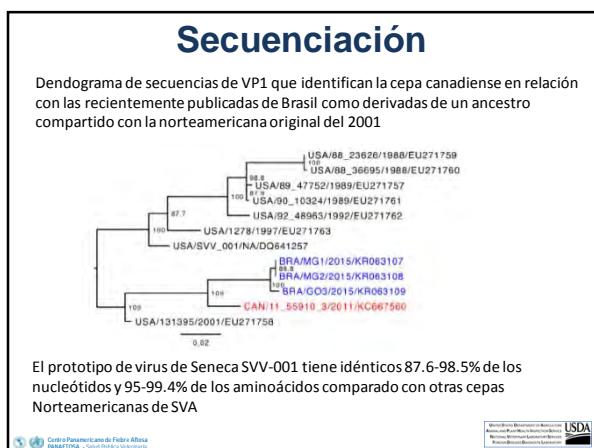
Diagnóstico bacteriano diferencial E. Coli Clostridium

Diagnóstico de laboratorio

- Identificación de Anticuerpos específicos
 - ❖ IELISA
 - ❖ cIELISA
 - ❖ Sero Neutralización
 - ❖ IFI-IPx en células infectadas
- Identificación del Agente infeccioso
 - ❖ Inmuno histoenzimática
 - ❖ Aislamiento viral
 - ❖ RT-PCR y rRT-PCR
 - ❖ Secuenciación

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFOSA - Salud Pública Veterinaria

USDA





Reporte de Diagnóstico

One swine serum was tested for the presence of antibodies against Foot-and-mouth disease (FMD) by VIAA and 3ABC ELISA, to vesicular stomatitis (VS, serotypes New Jersey and Indiana-1) by ELISA, to Vesicular Exanthema of Swine (VES) by IFA, and to Swine Vesicular Disease (SVD) by ELISA. Test results were all negative.

Vesicular swab, pharyngeal swab, epithelial tag and probang of pig #1 were tested for the presence of nucleic acid to FMDV, SVDV, VESV and VSV (serotypes NJ and Ind1) by real time RT-PCR. Test results were all negative.

Virus Isolation for vesicular swab, pharyngeal swab, epithelial tag and probang of pig #1samples were positive for cytopathic effect. Positive VI samples were tested by Antigen ELISA (Ag ELISA) for the presence of VSV, and for the presence of nucleic acid from FMD, VSV (nj and Ind1 serotypes), VESV, and SVDV viruses by rRTPCR. All tests results were NEGATIVE

Vesicular swab, pharyngeal swab, epithelial tag positive VI samples were tested for the presence of nucleic acid for Seneca Valley Virus (SVV) by RT-PCR. Test Results were POSITIVE.

Centro Panamericano de Fiebre Aflosa
PANAFIOSA - Salud Pública Veterinaria

United States Department of Agriculture
Animal Health Research Division
Animal Health Laboratory
Fiebre Aflosa Laboratory

Reporte de Diagnóstico

One swine serum was tested for the presence of **antibodies** against Foot-and-mouth disease (FMD) by VIAA and 3ABC ELISA, to vesicular stomatitis (VS, serotypes New Jersey and Indiana-1) by ELISA, to Vesicular Exanthema of Swine (VES) by IFA, and to Swine Vesicular Disease (SVD) by ELISA. Test results were all negative.

Vesicular swab, pharyngeal swab, epithelial tag and probang of pig #1 were tested for the presence of nucleic acid to FMDV, SVDV, VESV and VSV (serotypes NJ and Ind1) by real time RT-PCR. Test results were all negative.

Virus Isolation for vesicular swab, pharyngeal swab, epithelial tag and probang of pig #1samples were positive for cytopathic effect. Positive VI samples were tested by Antigen ELISA (Ag ELISA) for the presence of VSV, and for the presence of nucleic acid from FMD, VSV (nj and Ind1 serotypes), VESV, and SVDV viruses by rRTPCR. All tests results were NEGATIVE

Vesicular swab, pharyngeal swab, epithelial tag positive VI samples were tested for the presence of nucleic acid for Seneca Valley Virus (SVV) by RT-PCR. Test Results were POSITIVE.

Centro Panamericano de Fiebre Aflosa
PANAFIOSA - Salud Pública Veterinaria

United States Department of Agriculture
Animal Health Research Division
Animal Health Laboratory
Fiebre Aflosa Laboratory

Reporte de Diagnóstico

One swine serum was tested for the presence of antibodies against Foot-and-mouth disease (FMD) by VIAA and 3ABC ELISA, to vesicular stomatitis (VS, serotypes New Jersey and Indiana-1) by ELISA, to Vesicular Exanthema of Swine (VES) by IFA, and to Swine Vesicular Disease (SVD) by ELISA. Test results were all negative.

Vesicular swab, pharyngeal swab, epithelial tag and probang of pig #1 were tested for the presence of **nucleic acid** to FMDV, SVDV, VESV and VSV (serotypes NJ and Ind1) by real time RT-PCR. Test results were all negative.

Virus Isolation for vesicular swab, pharyngeal swab, epithelial tag and probang of pig #1samples were positive for cytopathic effect. Positive VI samples were tested by Antigen ELISA (Ag ELISA) for the presence of VSV, and for the presence of nucleic acid from FMD, VSV (nj and Ind1 serotypes), VESV, and SVDV viruses by rRTPCR. All tests results were NEGATIVE

Vesicular swab, pharyngeal swab, epithelial tag positive VI samples were tested for the presence of nucleic acid for Seneca Valley Virus (SVV) by RT-PCR. Test Results were POSITIVE.

United States Department of Agriculture
Animal Health Research Division
Animal Health Laboratory
Fiebre Aflosa Laboratory

Reporte de Diagnóstico

One swine serum was tested for the presence of antibodies against Foot-and-mouth disease (FMD) by VIAA and 3ABC ELISA, to vesicular stomatitis (VS, serotypes New Jersey and Indiana-1) by ELISA, to Vesicular Exanthema of Swine (VES) by IFA, and to Swine Vesicular Disease (SVD) by ELISA. Test results were all negative.

Vesicular swab, pharyngeal swab, epithelial tag and probang of pig #1 were tested for the presence of nucleic acid to FMDV, SVDV, VESV and VSV (serotypes NJ and Ind1) by real time RT-PCR. Test results were all negative.

Virus Isolation for vesicular swab, pharyngeal swab, epithelial tag and probang of pig #1samples were positive for cytopathic effect. **Positive VI samples** were tested by Antigen ELISA (Ag ELISA) for the presence of VSV, and for the presence of nucleic acid from FMD, VSV (nj and Ind1 serotypes), VESV, and SVDV viruses by rRTPCR. All tests results were NEGATIVE

Vesicular swab, pharyngeal swab, epithelial tag positive VI samples were tested for the presence of nucleic acid for Seneca Valley Virus (SVV) by RT-PCR. Test Results were POSITIVE.

Centro Panamericano de Fiebre Aflosa
PANAFIOSA - Salud Pública Veterinaria

United States Department of Agriculture
Animal Health Research Division
Animal Health Laboratory
Fiebre Aflosa Laboratory

Reporte de Diagnóstico

One swine serum was tested for the presence of antibodies against Foot-and-mouth disease (FMD) by VIAA and 3ABC ELISA, to vesicular stomatitis (VS, serotypes New Jersey and Indiana-1) by ELISA, to Vesicular Exanthema of Swine (VES) by IFA, and to Swine Vesicular Disease (SVD) by ELISA. Test results were all negative.

Vesicular swab, pharyngeal swab, epithelial tag and probang of pig #1 were tested for the presence of nucleic acid to FMDV, SVDV, VESV and VSV (serotypes NJ and Ind1) by real time RT-PCR. Test results were all negative.

Virus Isolation for vesicular swab, pharyngeal swab, epithelial tag and probang of pig #1samples were positive for cytopathic effect. Positive VI samples were tested by Antigen ELISA (Ag ELISA) for the presence of VSV, and for the presence of nucleic acid from FMD, VSV (nj and Ind1 serotypes), VESV, and SVDV viruses by rRTPCR. All tests results were NEGATIVE

Vesicular swab, pharyngeal swab, epithelial tag **positive VI samples were tested for the presence of nucleic acid for Seneca Valley Virus (SVV) by RT-PCR. Test Results were POSITIVE.**

United States Department of Agriculture
Animal Health Research Division
Animal Health Laboratory
Fiebre Aflosa Laboratory

Reporte Histopatológico

Histopathology Report

Date: 12/16/2009 Species: Swine

Accession #: 09-034037-8

Pathology #: 095072 Age: 3 weeks

LIMS #: 1203597 Sex: Female

Animal ID #: pig 1

Description: Formalin fixed tissues were submitted for histopathology.

Tonsil: Mild lympho-plasmacytic tonsillitis.

Kidney: Mild multifocal lympho-plasmacytic interstitial nephritis.

Lung, liver, spleen: No significant microscopic lesions.

Microscopic Diagnosis: No significant microscopic lesions

Comments: Mild interstitial nephritis and tonsillitis are common incidental findings of no clinical significance. These lesions are likely unrelated to the clinical signs of skin vesicular lesions described in this particular case. Skin lesions were not submitted for histopathology.

 Centro Panamericano de Fiebre Aflosa
PPAF/FOA - Salud Pública Veterinaria

 United States Department of Agriculture
Animal and Plant Health Inspection Service
Veterinary Services
Food Safety and Inspection Service

Lecturas de interés/refer.bibliográficas

- Anness, S.E. DVM, PhD, DABVP, et al. (2004). Idiopathic vesicular disease in a swine herd in Indiana. *Journal of Swine Health and Production*, 12(4), 192-196.
- Hales, L.M., et al. Complete genome sequence analysis of Seneca Valley Virus-001, a novel oncolytic picornavirus. (2008). *Journal of General Virology*, 89, 1265-1275.
- Knowles, N.J., et al. Epidemiology of Seneca Valley Virus: Identification and Characterization of isolates from Pigs in the United States. Poster.
- Marshall, D.T. (2012). *Three Vesicular Disease Incidents in Commercial Swine* [Powerpoint Slides].
- Pascola, M., D'Amato, S., & Shaw, S.L. (2008). Cross-Canada Disease Report: Idiopathic vesicular disease in swine in Manitoba. *Canadian Veterinary Journal*, 49, 48-49.
- Singh, K., corner, S., Clark, S.G., Scherba, G., & Fredrickson, R. (2012). Seneca Valley Virus and Vesicular Lesions in a Pig with Idiopathic Vesicular Disease. *J Vet Sci Technol*, 3(6).
- Snelson, H., et al.(2012). Proceedings from Committee on Transmissible Diseases of Swine: Report. Greensboro, NC.
- Wilcock, M.M., et al. (2011). Structural Features of the Seneca Valley Virus Internal Ribosome Entry Site (IRES) Element: a Picornavirus with a Pestivirus-Like IRES. *Journal of Virology*, 85(9), 4452-4461.
- Yang, M., van Bruggen, R., Xu, W. (2011). Generation and diagnostic application of monoclonal antibodies against Seneca Valley virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20(2), 1-9. <http://jvdmed.org>
- <http://www.europic.org.uk/urme/2006/posters/Knowles.SV.v01.pdf>
- P. et al. Real-time reverse transcription PCR assay for detection of Seneca Valley virus in swine vesicular diagnostic tissue samples. 2016. in press
- Knowles, N.J. (2005). A pan-picornavirus RT-PCR: identification of novel picornavirus species. EUROPIC 2005; XLIth Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses, Lunteren, The Netherlands, 23-29th May 2005, Abstract A06.
- Knowles, N.J. and Hallenbeck, P.L. (2005). A new picornavirus is most closely related to cardioviruses. EUROPIC 2005; XLIth Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses, Lunteren, The Netherlands, 23-29th May 2005, Abstract A14.

 Centro Panamericano de Fiebre Aflosa
PPAF/FOA - Salud Pública Veterinaria

 United States Department of Agriculture
Animal and Plant Health Inspection Service
Veterinary Services
Food Safety and Inspection Service

Reporte de Secuenciación

Sequencing Report from the Seneca Valley Virus RT-PCR amplification fragment:

Presence of Seneca Valley Virus genome in pool of vesicular swab, pharyngeal swab, epithelial tag samples was confirmed.

The purified 1 Kb PCR fragment previously obtained by PCR for SVV showed specific matching for the eight SVV sequencing primers contained within the predicted amplified region of the SVV genome.

BLAST results of the obtained consensus sequence **show 97% nucleotide identity** with the SVV 131395 strain (EU271758 Acc#) reported from feral swine in October 2001.

 Centro Panamericano de Fiebre Aflosa
PPAF/FOA - Salud Pública Veterinaria

 United States Department of Agriculture
Animal and Plant Health Inspection Service
Veterinary Services
Food Safety and Inspection Service

Historia Clínica

- En Octubre del 2016, dos tandas de cerdos, 330 animales en total, llegados al matadero procedentes de un único productor.
- Aproximadamente el 5% de los cerdos presentaban lesiones cutáneas vesiculares.
- No se describieron lesiones en mucosas, ni boca ni lengua.

 Centro Panamericano de Fiebre Aflosa
PPAF/FOA - Salud Pública Veterinaria

 United States Department of Agriculture
Animal and Plant Health Inspection Service
Veterinary Services
Food Safety and Inspection Service

Ejemplo Caso Diagnóstico 2016

 Centro Panamericano de Fiebre Aflosa
PPAF/FOA - Salud Pública Veterinaria

 United States Department of Agriculture
Animal and Plant Health Inspection Service
Veterinary Services
Food Safety and Inspection Service





Diagnóstico diferencial

- Fiebre Aftosa (FMD)
- Enfermedad Vesicular del cerdo (SVD)
- Virus Seneca A (SVA)

Muestras para diagnóstico recibidas

	Cerdo 1	Cerdo 2	Cerdo 3
Fluido de vesícula	Y	N	N
Tejido epitelial	Y	N	Y
Hisopado vesicular	Y	Y	N
Hisopado nasal	Y	Y	Y
Suero	N	N	N

Resultados de laboratorio

Hisopados/epitelio/fluido vesicular:

- rRT-PCR contra FMD en muestras originales- Negativo
- Aislamiento viral:
 - Cerdo 1 positivo
 - Cerdo 2 negativo
 - Cerdo 3 positivo
- rRT-PCR contra FMD en aislamientos- Negativo
- SVD PCR en aislamientos- Negativo
- SVA PCR en aislamiento- Positivo

Centro Panamericano de Fiebre Aflaca
PANAFDFA - Salud Pública Veterinaria

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural
Agencia Federal para la Bioseguridad
Agricultura y Desarrollo Rural
USDA

Diagnóstico Final

Seneca Valley A virus

Historia Clínica

- Cerdos traídos al matadero en 2/2016.
- El veterinario observa que el 50-60% de los animales cojeaban y tenían lesiones podales, y el 10% lesiones en jeta.
- 70 de los 118 cerdos estaban afectados.
- No se vieron vesículas intactas.
- Las lesiones podales en rodete coronario estaban abiertas, con piel muerta y posible necrosis.
- El origen vesicular de las lesiones era puramente conjetal.

Centro Panamericano de Fiebre Aflaca
PANAFDFA - Salud Pública Veterinaria

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural
Agencia Federal para la Bioseguridad
Agricultura y Desarrollo Rural
USDA



Centro Panamericano de Fiebre Aflaca
PANAFDFA - Salud Pública Veterinaria

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural
Agencia Federal para la Bioseguridad
Agricultura y Desarrollo Rural
USDA



Centro Panamericano de Fiebre Aflaca
PANAFDFA - Salud Pública Veterinaria

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural
Agencia Federal para la Bioseguridad
Agricultura y Desarrollo Rural
USDA



Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural
Agencia Federal para la Bioseguridad
Agricultura y Desarrollo Rural
USDA



PANAFTOZA - Salud Pública Veterinaria

USDA

Muestras para diagnóstico recibidas

- Prioridad 2
- Muestras tomadas de 5 animales
- Suero
- Sangre completa (EDTA y Heparin)
- Hisopados y tejido epitelial de las lesiones podales y de jeta

PANAFTOZA - Salud Pública Veterinaria

USDA

Resultados de Laboratorio

Swabs:

- VSV rRT-PCR- Negative
- VI- Positive
- FMD rRT-PCR using VI isolate- Negative
- VSV rRT-PCR using VI isolate- Negative
- SVD rRT-PCR using VI isolate- Negative
- SVA virus rRT-PCR using VI isolate- Positive

PANAFTOZA - Salud Pública Veterinaria

USDA

Diagnóstico diferencial

- FMD
- VSV
- SVD
- Seneca Valley A virus

• Note: VES no se considera ya como un riesgo significante por lo que el diagnóstico solo se realiza cuando todo lo demás es negativo

PANAFTOZA - Salud Pública Veterinaria

USDA

Resultados de Laboratorio

Serum:

FMD 3ABC ELISA- negative

PANAFTOZA - Salud Pública Veterinaria

USDA

Diagnóstico Final

- Idiopathic vesicular disease caused by Seneca Valley A virus.

PANAFTOZA - Salud Pública Veterinaria

USDA

• Karen Moran
• Emily O'Hearn
• Kate Schumann
• Harrison Bergeron
• Heather Petrowski
• Alexa Bracht
• Andrew Fabian
• Marylou Berninger
• Karissa Lemire
• Fawzi Mohamed
• Gregory Mayr
• Consuelo Carrillo
• Karyn Havas

FADDL-DSS Team



A photograph showing a coastal landscape. In the background, a white lighthouse stands on a grassy hill overlooking a sandy beach. The ocean waves are crashing onto the shore. The sky is clear and blue.

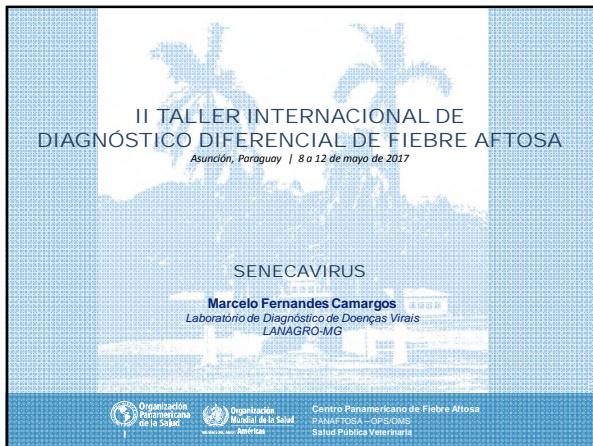
Centro Panamericano de Fondo Altoza
PANAFTOSA - Centro de Trabajo en Salud Pública

USDA

www.paho.org/panaftosa



Twitter/[panaftosa_inf](#) Facebook/[kmcPANAFTOSA](#)

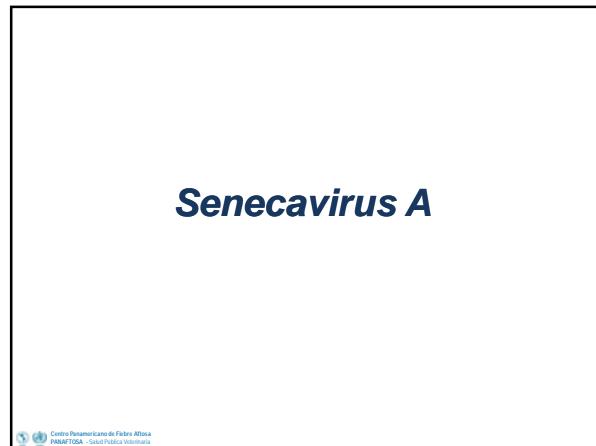


Senecavirus A

Senecavirus A

- Diagnóstico clínico (FORM-IN)
 - Mucosa vermelha ulcerada com tecido de granulação na base do focinho em matrizes paridas;
 - Lesões vesiculares na borda superior do focinho e patas em matrizes paridas (1 a 3 %);
 - Temperatura: 38 a 40,5 °C;
 - Claudicação;
 - Lesões no coxim palmar e plantar, e na muralha do casco (com descolamento do casco) em matrizes, terminação e leitões;

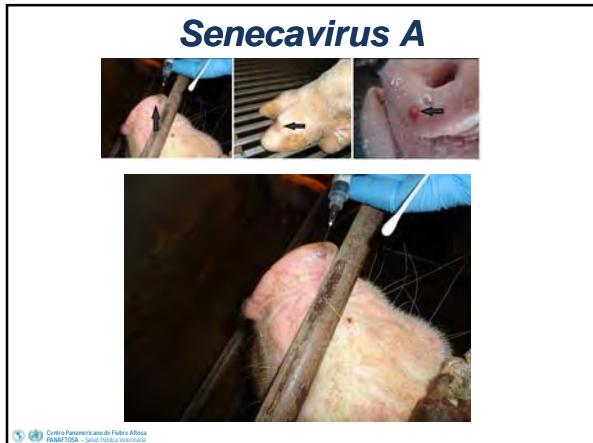
Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PAHAFIA - Salud Pública Veterinaria



Senecavirus A

- Diagnóstico clínico (FORM-IN)
 - Diarreia aquosa em leitões de 1 a 4 dias com alta mortalidade (15 a 20 %);
 - Lesões em leitões: em alguns rebanhos;
 - Diminuição na ingestão de alimentos;
 - Duração dos sinais clínicos: 2 semanas
 - Aumento e edema de linfonodos, estômago vazio, ascite, edema do mesocôlon.

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PAHAFIA - Salud Pública Veterinaria



Senecavirus A



Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFcosa - Salud Pública Veterinaria

Senecavirus A



Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFcosa - Salud Pública Veterinaria

Senecavirus A



Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFcosa - Salud Pública Veterinaria

Senecavirus A



Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFcosa - Salud Pública Veterinaria

Senecavirus A

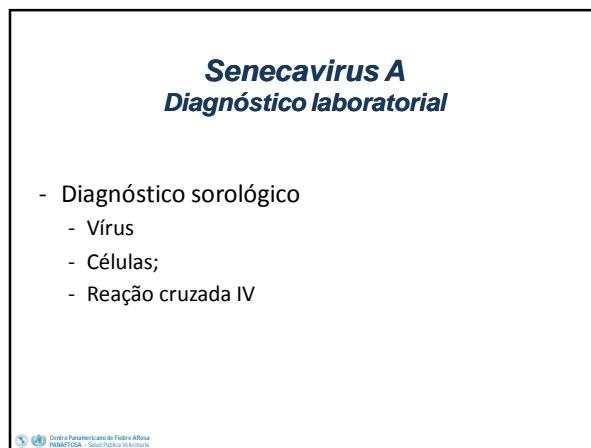
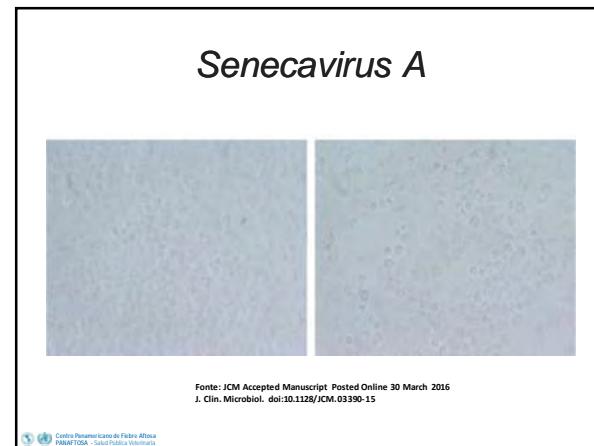
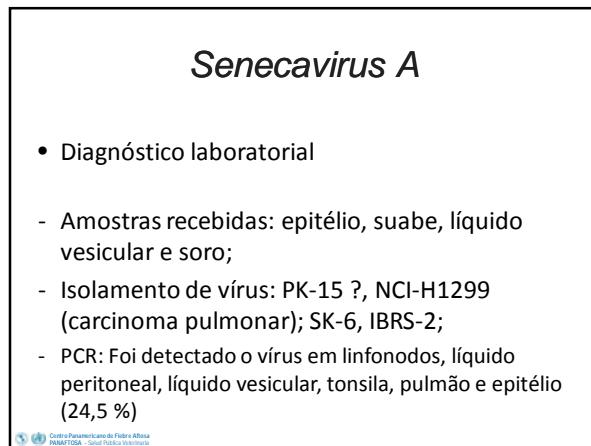
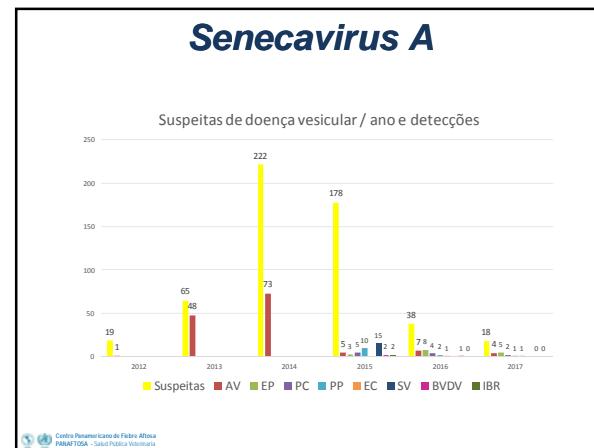
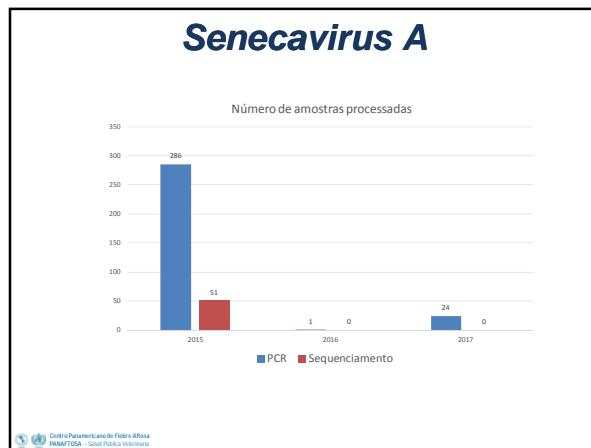


Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFcosa - Salud Pública Veterinaria

Senecavirus A



Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFcosa - Salud Pública Veterinaria



Senecavirus A

Método: IEL/LDV/PL023 V 4 (Indiana 1)
Ensaios: Detecção de anticorpos para o vírus da Estomatite Vesicular por Neutralização Viral (Indiana 1)

Amostra	Matriz	Identificação	Espécie	Resultado
LDDV-2015-0191-0001	Soro Sanguíneo	1 - 1532	Sulino	Reagente (1,3)
LDDV-2015-0191-0002	Soro Sanguíneo	2 - 1568	Sulino	Reagente (1,6)
LDDV-2015-0191-0003	Soro Sanguíneo	3 - 1901	Sulino	Reagente (1,9)
LDDV-2015-0191-0004	Soro Sanguíneo	4 - 1924	Sulino	Reagente (1,3)
LDDV-2015-0191-0005	Soro Sanguíneo	5 - 1533	Sulino	Reagente (1,9)
LDDV-2015-0191-0006	Soro Sanguíneo	6 - 1218	Sulino	Reagente (2,2)
LDDV-2015-0191-0007	Soro Sanguíneo	7 - 2102	Sulino	Reagente (2,5)
LDDV-2015-0191-0008	Soro Sanguíneo	8 - A450	Sulino	Reagente (1,6)
LDDV-2015-0191-0009	Soro Sanguíneo	9 - 1580	Sulino	Reagente (1,9)
LDDV-2015-0191-0010	Soro Sanguíneo	10 - 1847	Sulino	Reagente (2,2)
LDDV-2015-0191-0011	Soro Sanguíneo	11 - 1794	Sulino	Reagente (1,3)
LDDV-2015-0191-0012	Soro Sanguíneo	12 - 1512	Sulino	Reagente (1,6)
LDDV-2015-0191-0013	Soro Sanguíneo	13 - 1520	Sulino	Reagente (2,2)
LDDV-2015-0191-0014	Soro Sanguíneo	14 - A579	Sulino	Reagente (2,5)
LDDV-2015-0191-0015	Soro Sanguíneo	15 - 628	Sulino	Reagente (1,9)
LDDV-2015-0191-0016	Soro Sanguíneo	16 - 1477	Sulino	Reagente (1,9)
LDDV-2015-0191-0017	Soro Sanguíneo	17 - 2088	Sulino	Reagente (1,3)

Centro Panamericano de Fábris Atípicas
PAFFA - Saúde Pública e Inovação

Problemas



VÍDEO

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
FAO/EPPO - Sanidad Animal Interna

Problemas



Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
FAO/EPPO - Sanidad Animal Interna

Problemas



Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
FAO/EPPO - Sanidad Animal Interna

Problemas



Problemas



Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
FAO/EPPO - Sanidad Animal Interna

Problemas



Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
FAO/EPPO - Sanidad Animal Interna

Problemas



 Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PAHOFIOA - Sanidad Animal Interamericana

Problemas



 Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PAHOFIOA - Sanidad Animal Interamericana

Problemas

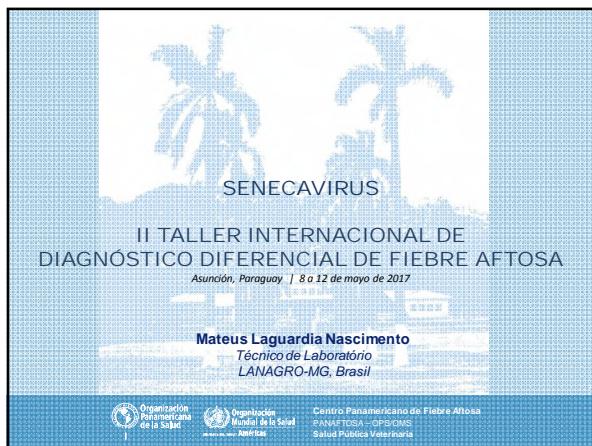


 Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PAHOFIOA - Sanidad Animal Interamericana

www.paho.org/panaftosa

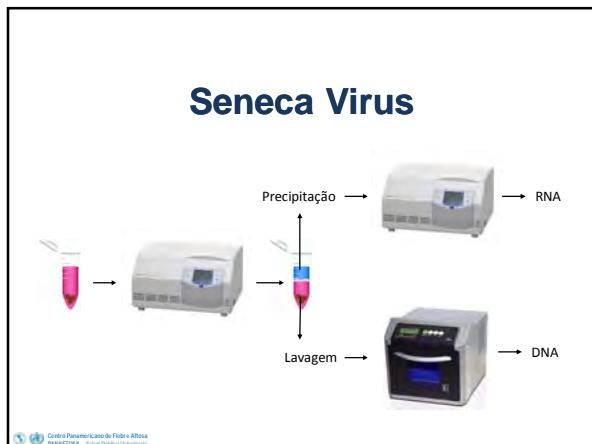


marcelo.camargos@agricultura.gov.br



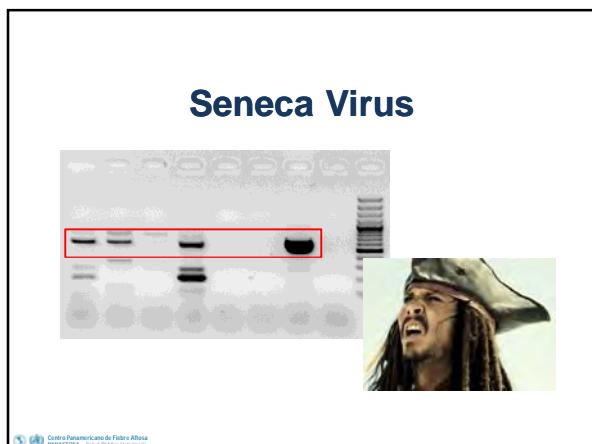
Seneca Virus

- Recebimento das amostras
 - Quadro de doença vesicular
 - Protocolo padrão de diagnóstico diferencial para doença vesicular
 - Extração do RNA pelo método do Trizol
 - Extração do DNA por extratores automáticos
 - Bateria de PCRs convencionais e em tempo real para diagnóstico de várias doenças



Seneca Virus

- PCRs em Tempo Real:
 - FMDV
 - Coxsackievirus
 - VZV
 - Orthopox
 - Parapox
 - SV40pox
 - FCV
 - Beta-actina
- PCRs Convencionais:
 - SIV
 - VZV
 - VSIV
 - VSJV
 - VSIV ✓



Seneca Virus



Palma, palma, não priemos cônico!
Qué no panda el cúnico!

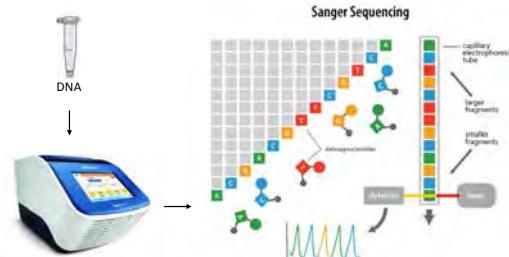
Seneca Virus



Solubilização Ligação Lavagem Eluição DNA

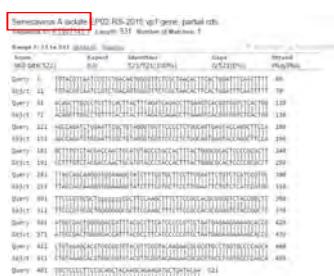
Centro Panamericano de Fiebre Amorfa

Seneca Virus



Centro Panamericano de Fiebre Altosa

Seneca Virus



 Centro Panamericano de Fiebre Amorfa

Seneca Virus

- Após o sequenciamento e o diagnóstico da infecção pelo Seneca Valley Virus (SVV), foram desenhados iniciadores específicos para este vírus, com base nas sequências disponíveis no GenBank.

Seneca Virus

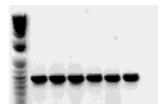
- Convencionais:

- PCR SVV 215
 - Região: 3D
 - Amplicon: 215 pb



- PCB SVV 464-

- Região: 3D
 - Amplicon: 464 pb

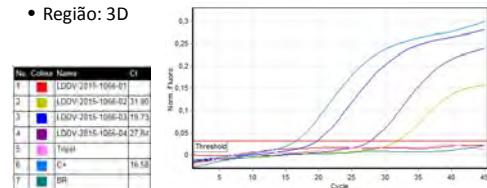


 Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOSA - Salud Pública Veterinaria

Seneca Virus

- Tempo Real:

- ## – PCR SVV 78



Centro Panamericano de Fibros Altos

Seneca Virus

- Tempo Real:
 - PCR SVV 138
 - Região: 3D

Centro Panamericano de Febre Aftosa
PARAFOSA - Saúde Pública Veterinária

Seneca Virus

- Testes com outras matrizes:
 - Soro
 - Viremia curta, de 3-10 dias p.i.
 - Swabs (literatura)
 - Virus detectável até 28 dias p.i. em secreções orais e nasais
 - Fragilidade da amostra

Centro Panamericano de Febre Aftosa
PARAFOSA - Saúde Pública Veterinária

Seneca Virus

Centro Panamericano de Febre Aftosa
PARAFOSA - Saúde Pública Veterinária

Seneca Virus

Centro Panamericano de Febre Aftosa
PARAFOSA - Saúde Pública Veterinária

Seneca Virus

Centro Panamericano de Febre Aftosa
PARAFOSA - Saúde Pública Veterinária

- Evidências moleculares:
 - Origem comum
 - Vírus presente antes de 2015?
 - Relatos em 2014
 - Não é possível apontar uma porta de entrada, ou ponto inicial de disseminação
 - Trânsito de animais?
 - Sêmen?
 - Moscas?

Seneca Virus

The Veterinary Journal
Volume 216, October 2016, Pages 287-290

Márcia Lúcia Resende^a, Márcia R. Escrivani^b, Enny B. Bahl^a, Anderson V. Rovatti^a, Isoldia M. Souza^a, Angélica M. Oliveira^a, Mariana F. Carneiro^c, Tatiana T. Pinto-de Oliveira^c, José FM Gonçalves^c, Márcia C. Oliveira^c, Demissor F. Ribeiro^c, Iziane V. Mazzoni^c, Débora K. Bittencourt^c,
^aMinistério da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural, Instituto Ulysses Góes, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil;
^bCentro de Pesquisas Agropecuárias, Escolar Chico-Bois-Francolin, Cláudia-Atensuliflora, Rio Grande do Sul, Brasil;
^cLaboratório de Virologia Básica e Aplicada, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil
Received 25 April 2016; Accepted 10 August 2016; Available online 21 August 2016

Download
 Show tree
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetj.2016.08.011>

Centro Panamericano de Febre Aftosa
PARAFOSA - Saúde Pública Veterinária

Seneca Virus

- Perspectivas:

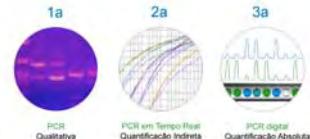
- Sequenciamento total do genoma utilizando técnicas de sequenciamento de nova geração
- Tese em andamento: “Caracterização do *Senecavirus A* e de outros vírus em amostras de suínos provenientes dos surtos de doenças vesiculares ocorridos no Brasil utilizando técnicas independentes de isolamento”

 Centro Panamericano de Febre Aftosa
FAO/CPFA - Saúde Pública Veterinária

Seneca Virus

- Perspectivas:

- Estabelecimento do uso da PCR digital para diagnósticos



 Centro Panamericano de Febre Aftosa
FAO/CPFA - Saúde Pública Veterinária

Seneca Virus



 Centro Panamericano de Febre Aftosa
FAO/CPFA - Saúde Pública Veterinária

Seneca Virus

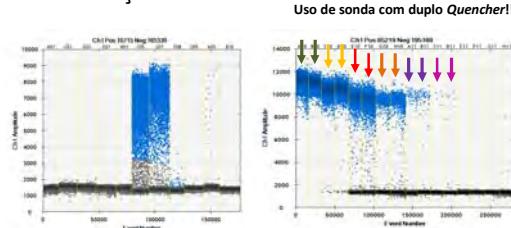
- Vantagens:

- Quantificação absoluta
- Precisão entre réplicas incomparável
- Exatidão (muito maior que em qPCR)
- Aumento da relação sinal-ruído
- Elevada resistência a inibidores de PCR

 Centro Panamericano de Febre Aftosa
FAO/CPFA - Saúde Pública Veterinária

Seneca Virus

- Padronização



 Centro Panamericano de Febre Aftosa
FAO/CPFA - Saúde Pública Veterinária

Seneca Virus

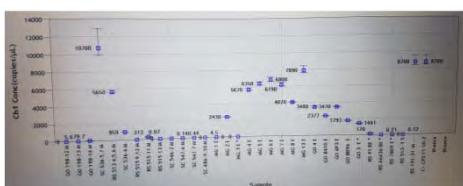
- Outras informações trazidas pela ddPCR
 - Número de eventos (gotas) positivos



 Centro Panamericano de Febre Aftosa
FAO/CPFA - Saúde Pública Veterinária

Seneca Virus

- Outras informações trazidas pela ddPCR
 - Concentração (Cópias por μl)



 Centro Panamericano de Física e Altas Temperaturas (PAFTOSA) - Centro de Pesquisas

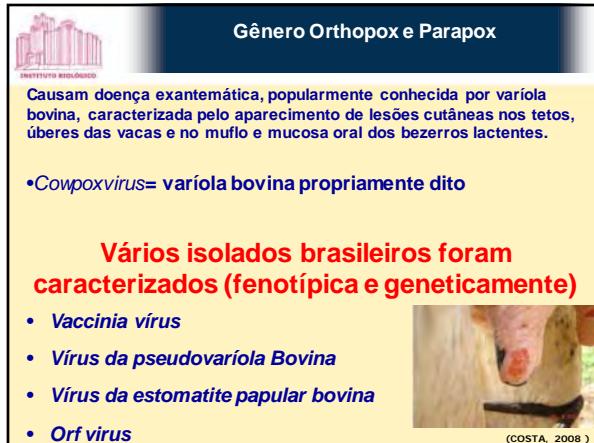
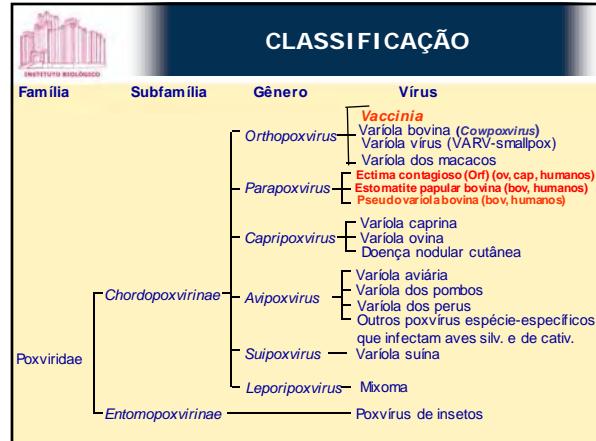
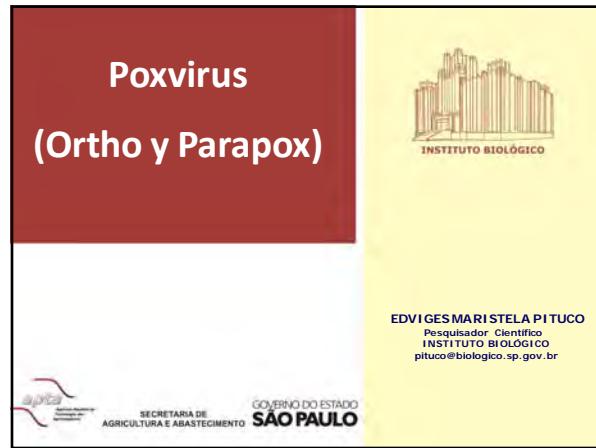
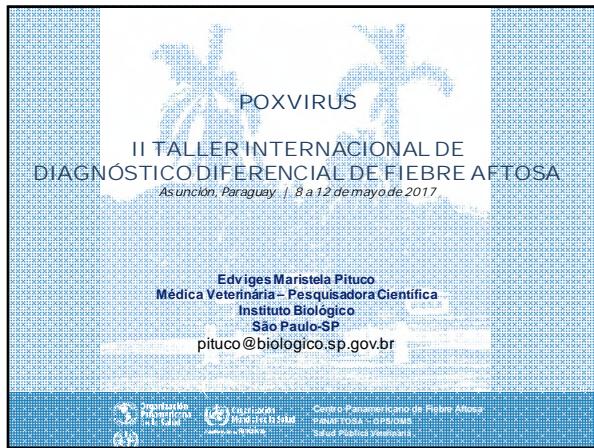
www.paho.org/panaftosa

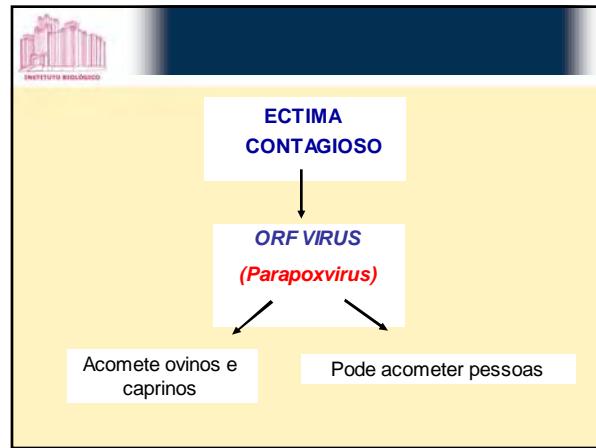
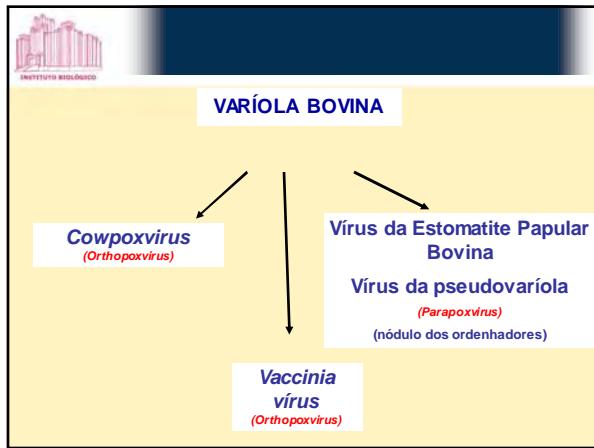


mateus.nascimento@agricultura.gov.br
mateuslaguardia@gmail.com

Twitter/panaftosa_inf Facebook/kmcPANAFTOSA

POXVIRUS





Os *Orthopoxvirus* apresentam reação imunológica cruzada - após infecção e/ou imunização com qualquer vírus desse gênero ocorre uma resposta protetora frente aos demais.



Distribuição geográfica

TABLE 1. Host range and geographic distribution of genera and unclassified members of the subfamily Chordopoxvirinae

Genus and species	Reservoir host	Geographic distribution	Other naturally infected hosts
<i>Orthopoxvirus</i>			
Camelpox virus	Camels	Africa, Asia	Nil
Cowpox virus	Rodents	Europe, western Asia	Cats, cows, zoo animals, humans ^{a,b,c}
Ectromelia virus	Rodents	Europe	Nil
Monkeypox virus	Squirrels	Western and central Africa	Monkeys, humans ^{a,d}
Raccoon poxvirus	Raccoons	Eastern USA	Nil
Skunk poxvirus	Skunks	Western USA	Nil
Tatera poxvirus	Gerbils	Western Africa	Nil
Uasin Gishu virus	Unknown	Eastern Africa	Horses
Micepox virus	Unknown	Worldwide	Humans ^{a,b} , rabbits, cows, river buffaloes (<i>Bubalis</i>)
Variola virus	Humans ^{a,d}	Worldwide (eradicated)	Nil
Volepox virus	Voles	Western USA	Nil
Parapoxvirus			
Audryk virus	Camels	Africa, Asia	Nil
Bovine papular stomatitis virus	Cattle	Worldwide	Humans ^{a,b}
Orf virus	Sheep	Worldwide	Other ruminants, humans ^{a,b}
Pseudocowpox virus	Cattle	Worldwide	Humans ^{a,b}
Red deer poxvirus	Red deer	New Zealand	Nil
Seal parapoxvirus	Seals	Worldwide	Humans ^{a,b}

Orthopoxvirus

UNIVERSITÀTIO BIOLOGICO

- Família *Poxviridae*
- Subfamília *Chordopoxvirinae*
- Gênero *Orthopoxvirus*
- DNA fita dupla linear, envelopado
- Envelopado
- Replicação no citoplasma da célula
- São grandes e complexos 300 a 400 nm

Orthopoxvirus em microscopia eletrônica convencional em contraste negativo (A), em microscopia cryo-elettrônica (B) e em corte ultrafino (C).
Fonte: <http://www.ibt.tamushsc.edu/faculty/pics/Vacinaria%20AFM-EM.jpg>

Parapoxvirus

UNIVERSITÀTIO BIOLOGICO

- Família: *Poxviridae*;
- Subfamília: *Chordopoxvirinae*.
- Gênero: *Parapoxvirus*
- Vírus DNA de fita dupla;
- Envelopado
- São grandes e complexos 300 a 400 nm

Figura 1. Estrutura dos vírus (ver anexo de resumo, versão impressa)

HISTÓRICO VARÍOLA BOVINA

UNIVERSITÀTIO BIOLOGICO

- Varíola foi pela primeira vez assim designada no ano 570 D.C por Bishop Marius de Avenches, na Suíça. A palavra deriva do latim, *varius* ou *varus* que significa bexigas.
- O cowpox é tão antigo no mundo quanto o smallpox (varíola virus). Historicamente o termo cowpox foi aplicado indiscriminadamente para toda doença em vacas com lesões pustulares locais ou generalizadas e exantema na pele e mucosa de úbere e tetos.
- JENNER (1798) relatou o vírus cowpox como meio para prevenir smallpox. Desafiou com vírus da varíola, pacientes previamente inoculados com o cowpox, e verificou que estavam imunes.

HISTÓRICO VARÍOLA BOVINA

UNIVERSITÀTIO BIOLOGICO

Extracção de material infecioso para inoculação em indivíduos saudáveis (vesícula do teto de vaca provavelmente infectada com cowpox).

A campanha contra a varíola a partir 1966, coordenada pela OMS, obteve sucesso após massiva vacinação com vacina viva produzida com vírus vaccinia. O último caso de infecção natural ocorreu em 1977. Em 1980 a OMS fez o anúncio oficial da erradicação Mundial da doença.

Aplicação (por escarificação) da primeira vacina contra varíola em 1796. Edward Jenner (1749-1823)

Foto CDC: Robert J. Baldwin

VACCÍNIA VÍRUS

UNIVERSITÀTIO BIOLOGICO

- Agente utilizado na formulação da vacina para erradicar a varíola, a doença mais mortal desde o início da civilização
- Possivelmente derivado do cowpox após sucessivas passagens em ovo embrionado e em coelhos (produto de recombinação genética);
- Campanha global iniciada na década de 1960, foi um sucesso sendo o último caso ocorrido em 1977 na Somália.
- Atualmente cowpoxvirus e vaccinia vírus podem ser claramente distinguidos com métodos diagnósticos disponíveis, contudo a origem e história natural do VACV ainda gera muita discussão

HISTÓRICO VARÍOLA BOVINA

UNIVERSITÀTIO BIOLOGICO

- O vaccinia vírus foi eficiente para proteção - vírus estável, permitiu produção de vacina baixo custo, baixa patogenicidade, resposta rápida e proteção imunológica duradoura. Além disso a erradicação foi facilitada pois não havia reservatório do smallpox.
- Em 1980 a varíola foi declarada erradicada pela OMS, após um intensivo programa de vacinação usando diferentes estípes de vírus vaccinia.
- Atualmente é a espécie viral mais estudada entre os poxvírus e tem sido utilizado como o protótipo para elucidar muitos aspectos relacionados à biologia, resposta imune, patogênese, evasão do hospedeiro e filogenia do OPXV. Apesar disso a origem e reservatório permanecem incertas.



HISTÓRICO VACCÍNIA VÍRUS NO BRASIL

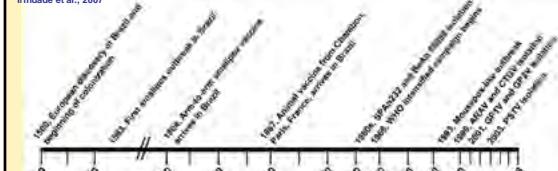
- 1804 Vacina chegou ao Brasil
- Até 1950 não houve campanha nacional de vacinação - apenas durante surtos
- 1966 - Intensificação do programa global de vacinação – foi utilizado cerca de 4 diferentes cepas vacinais durante a campanha
- 1960 - Isolamento do vaccinia vírus em roedores na Amazônia
- Nos anos 60 e 70 pesquisadores do Adolfo Lutz isolaram de camundongos.
- Em 1971 cessou a campanha de vacinação.



Varíola humana (smallpox), varíola bovina e correlação com uso da vacina no Brasil

1500 – Descobrimento do Brasil e início da colonização;
 1563 – 1º surto de smallpox no Brasil;
 1804 – Vacina para o smallpox “braço a braço” chega no Brasil;
 1887 – Vacina animal chega ao Brasil vinda de Chambon-Paris;
 1960 – Intensificação campanha global pela WHO –
 após isolamento de duas estirpes vaccinia em 1966;
 1993 – Isolamento do poxvírus em camundongos;
 1999 – Isolamento do ARAV no LVB/Instituto Biológico (publicação 2003);
 2001 – Isolamento estirpes vaccinia GP1V e GP2V
 2003 – Isolamento PSTV

Trindade et al., 2007



HISTÓRICO VACCÍNIA VÍRUS NO BRASIL

A partir da década de 90 estirpes de *vaccinia vírus* foram isoladas de bovinos.
 Acreditou-se que surtos de VACV estivessem relacionados a uma adaptação do VACV vacinal a algum hospedeiro selvagem ainda não identificado, reemergindo esporadicamente.
 Entretanto estudos sugerem que a origem e a história natural do VACV é distinta dos vírus vacinais usados no Brasil.
 A hipótese mais aceita é a persistência desse vírus em reservatórios naturais e dependendo das condições biológicas e geográficas são transmitidas para animais e humanos.



COWPOXVIRUS

- Reservatórios naturais: roedores
- Grande variedade de hospedeiros
 - Ratos
 - Gatos
 - Gerbils
 - Felinos
 - Elefantes
 - Rinocerontes
 - Vacas
 - Humanos



COWPOXVIRUS

EVIDÊNCIAS TRANSMISSÃO POR ROEDORES

- Surto em felinos alimentados com ratos infectados, inquéritos sorológicos comprovam essa transmissão
- Gatos domésticos infectados após caçar ratos



COWPOX - SINAIS CLÍNICOS NO HOMEM

- Transmissão por roedor



Tom F.W. Wolfs¹, Jaap A. Wagenaar¹, Hubert G.M. Niesters¹, and Albert D.M.E. Osterhaus². Rat-to-Human Transmission of Cowpox Infection.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1262009/>



VACCINIA VIRUS

Reservatórios naturais ainda desconhecidos, embora alguns estudos sugerem que os roedores podem representar o reservatório natural de VACV

Describa em:

- Humanos
- Vacas
- Búfalos
- Suínos
- Coelhos



DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

– Varíola bovina:

- Europa
- Ásia

– Vaccinia bovina

- Mundial
- Em consequência a vacinação de pessoas até a década de 80 com vírus vivo originário de lesões de vacas?

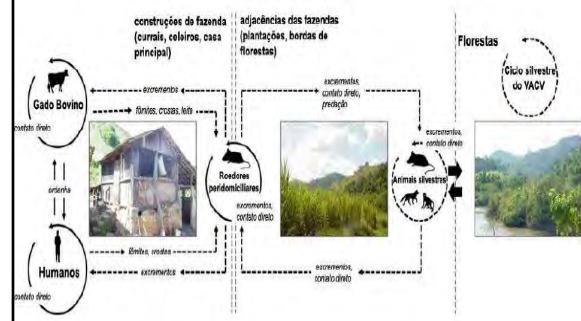


VACCÍNIA BOVINA NO BRASIL

- Surtos periódicos em rebanhos leiteiros
- Mais investigações são necessárias para esclarecer reservatórios e transmissão do vírus



Transmissão *vaccinia* vírus



TRANSMISSÃO VACCINIA VÍRUS

Bovinos

Contato direto



Equipamentos de ordenha mecânica

Fômites

Excrementos roedores



TRANSMISSÃO VACCINIA VÍRUS

Homem

Contato direto com as lesões de tetos e úberes das vacas acometidas



Lesões em teto e ubre
Foto Marina Gia Pereira. Tese doutorado – UNESP Botucatu, 2016.

INSTITUTO BIOLOGICO

Transmissão *vaccinia* vírus entre propriedades



Principais fatores de risco:

- Introdução de bovinos infectados
- Excrementos de animais silvestres possíveis reservatórios
- Ordenhadores
- Condições higiênico-sanitárias inadequadas
 - Propriedades não tecnificadas - ordenha manual
 - Rebanhos leiteiros - maioria

INSTITUTO BIOLOGICO

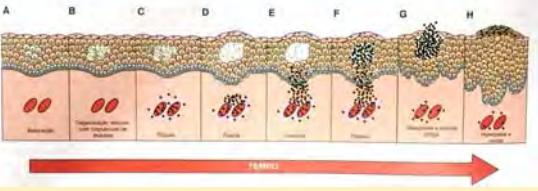
Manifestação clínica

Animais

- Eritema □ papulas □ vesículas □ pústulas □ úlceras crostas - tetos (maioria) e úbere.
- Curso clínico por volta de 15 dias e as lesões regredem espontaneamente.
- Sensibilidade ao toque
- Mastites
- Queda na produção leite
- Lesões similares no focinho e boca de bezerros

INSTITUTO BIOLOGICO

LESÕES CAUSADAS POR POXVIRUS



Esquema ilustrativo de uma lesão por poxvírus no decorrer do tempo
Fonte: Patologia Veterinária- McGavin, et al. (2009).

INSTITUTO BIOLOGICO

Manifestação clínica *vaccinia* vírus em vacas



(COSTA, 2008)

INSTITUTO BIOLOGICO

Manifestação clínica *vaccinia* vírus em vacas

Infecções oportunistas - Mastites

Case Report: Intramammary co-infection by *vaccinia* virus and *staphylococcus aureus* in a bovine *vaccinia* outbreak

João Marcelo Azevedo de Paula Antunes, Mário Garcia Ribeiro and Jônio Megal

Abstract: Bovine vaccinia virus (BVV) is a well-known zoonotic agent related to intramammary lesions in cattle and bovine mastitis, characterized by the formation of vesicular, hemorrhagic and necrotic lesions in the mammary glands of dairy herds. Bovine intramammary infections are caused mainly by bacterial organisms, such as *staphylococcus aureus*, *coagulase-negative staphylococci* and *Escherichia coli*. BVV and *Staphylococcus aureus* co-infection in cattle has not been reported previously.

Case presentation: During an outbreak of extramammary bovine MVZ infection with *vaccinia* virus, mastitis cases and hemorragic ulcers on the teats of 100 animals were collected for microbiological analysis.

Conclusion: The present report describes a case of intramammary co-infection by BVV and *S. aureus* in cattle.

Received: 18 September 2014
Accepted: 11 December 2014

Lesões VACV em tetos vacas. Pústulas hemorrágicas e ulceradas.
Azevedo, J.M et al 2015. DOI 10.1093/jnmcr.0.000009

INSTITUTO BIOLOGICO

Manifestação clínica *vaccinia* vírus em vacas



Eritema cutâneo mufo e mucosa nasal de bezerro
Foto: Marina Góes Peres Tese doutorado –UNESP Botucatu, 2016.

VACCINIA BOVINA
Sintomas em humanos

Em humanos, a infecção é caracterizada pela presença de lesões ulcerativas e pustulares principalmente nas mãos, podendo acometer antebraços e face, além de febre, dor, mal-estar e linfadenopatia (LOBATO et al., 2005).

Lesões em mão e antebraço de ordenhador
Foto: Marina Gea Peres Tese doutorado – UNESP Botucatu, 2016.

(MADUREIRA, 2009)

PSEUDOVARÍOLA BOVINA

Parapoxvirus

A imunidade não é duradoura = casos reincidentes na propriedade
Doença crônica nos rebanhos – Há relatos de vacas infectadas naturalmente e experimentalmente, sem apresentar sinais clínicos (IKETANI et al. 2002)

Foto: Dr SAMIR ARBACHE (dermatologista
São José dos Campos

LESÃO CUTÂNEA PACIENTE SUSPEITO INFECÇÃO ORF VÍRUS

- Hipertermia, lesões cutâneas nas mãos, braços e rosto; podendo ocorrer infecção secundária. Frequentemente acompanhada por adenopatia axilar, principalmente em indivíduos com deficiência imunológica.
- As lesões assemelham-se as de vacinação primária por vaccinia vírus.

Fonte: Arquivo do Laboratório de Viroses de Bovídeos – Instituto Biológico

Exame histopatológico

Lesão de pele humana - vesícula – degeneração balonosa causada por orf vírus.
Coloração HE. As setas indicam inclusão eosinofílica citoplasmática

Fonte: Arquivo do Laboratório de Anatomia Patológica – Instituto Biológico

Lesões verrucosas PSEUDOVARÍOLA BOVINA X BVDV

Parapoxvirus associado ao BVDV caso em bovino ocorrido Pará 2016

Aves, PA; et al. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 49 (2016) 70–75, 2016

ECTIMA CONTAGIOSO - ORF VÍRUS

Ovinos (*parapoxvirus*)

BRUNA LAPENNA SANCHES FERRIBRA

Ectima contagioso

Fotos: Bruna Lapenna Sanches Ferreira

FERREIRA, B.L.S., et al. Associação da ocorrência do ectima contagioso (ORF vírus) em ovinos com os cuidadores desses animais. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. [online]. 2016, vol.68, n.6, pp.1523-1530. ISSN 1678-4162. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-8578>.

Ectima contagioso

Cordeiros são mais afetados (ausência de imunidade). Lesões ao redor da boca e narinas. Lesões nos tetos em fêmeas lactantes

Lesões por ORF vírus (ectima contagioso)
Fotos: Bruna Lapenna Sanches Ferreira

Pseudovaríola Bovina

Bovino com lesão na gengiva
Fonte: INDEA – MT (Décio Santelo)

Bovino com lesão na língua
Fonte: INDEA – MT (Serafim Martines)

Estomatite Papular Bovina

Fonte: INDEA – MT (José Candido de Souza)

LESÃO EM TETO DE VACA

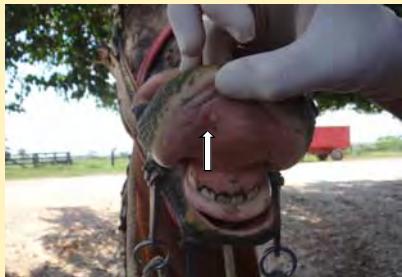
Lesões causadas pelo vírus da pseudovaríola bovina
Fonte: INDEA

Lesões em tetos vacas

Fotos: Balaro RJ



Lesão em equinos



Fonte INDEA – MT (Leone)



DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Humanos:

- Vaccinia
- Cowpox
- Pseudocowpox
- Ectima contagioso
- Herpes
- Esporotricose
- Carbúnculo
- Abcesso por *Staphylococcus*
- Inoculação vaginal
- Granuloma por corpo estranho



DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Bovinos:

- Vaccinia
- Cowpox
- Pseudocowpox
- Ectima contagioso
- Mamilita Herpética bovina (BoHV-2)
- Ulcerações causadas por intoxicações
- Abcessos causados por bactérias
(ex.*Staphylococcus*) em teto e úbere



DIAGNÓSTICO

BASEIA-SE NA ANÁLISE CONJUNTADA:

- Informações epidemiológicas
- Sinais clínicos
- Exame laboratorial



INFORMAÇÕES EPIDEMIOLOGICAS

- Restrito a uma área?
- Manejo dos animais
- Lesão localizada ou generalizada.
- Espécies acometidas.
- Casos reincidentes?
- Pessoas envolvidas?



COLHEITA DE MATERIAL



Meios e materiais para colheita

- Líquido das vesículas, fragmento das lesões e crostas



Fonte: Arquivo do Laboratório de Vírus de Bovídeos – Instituto Biológico



COLHEITA DE MATERIAL

- ✓ BIÓPSIA- *punch*® estéril descartável (6 mm);



Foto: Bruna Lapenna Sanches Ferreira



Punch de Biópsia 6mm

- ✓ Meio de transporte - seguir recomendado pelo programa do país

- ✓ Resfriado a 4°C;

- ✓ Encaminhar ao laboratório



Estomatite Papular Bovina



Fonte: IDAF - Acre (Mario Cesar Souza de Araújo)



Biópsia para detecção direta do vírus



Um fragmento conservar sob refrigeração e outro em formol



AMOSTRAS

Epitélio Bovino



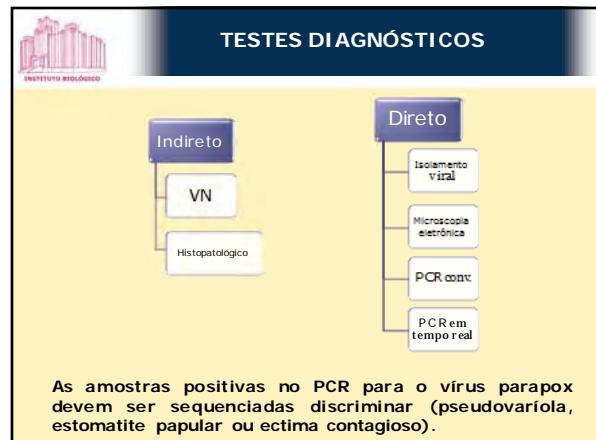
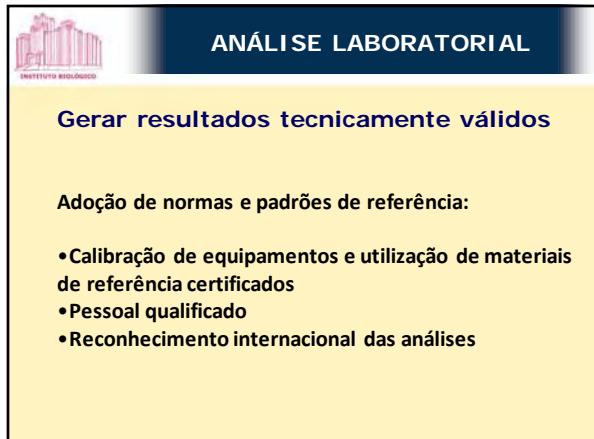
Acompanhada de Formulário de coleta de amostras (FORM LAB)

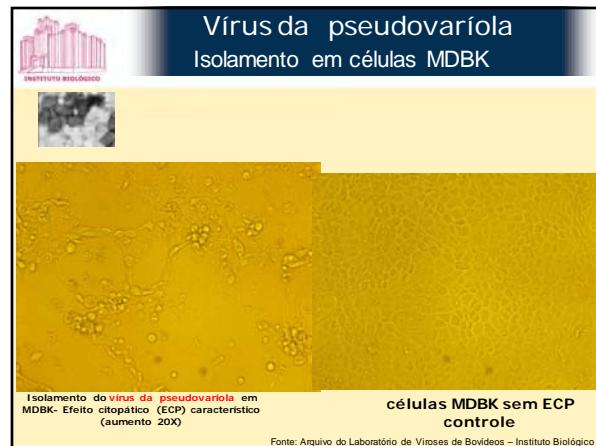
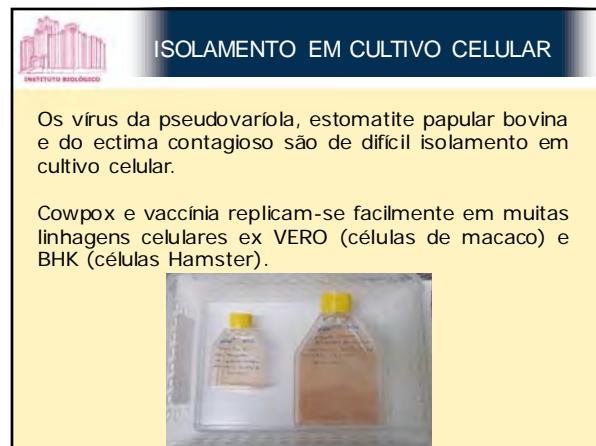
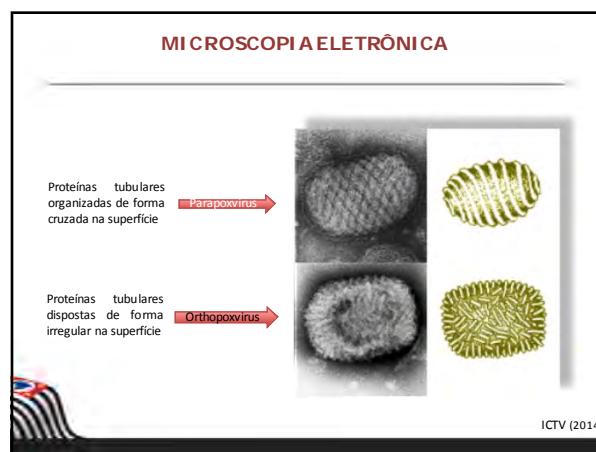
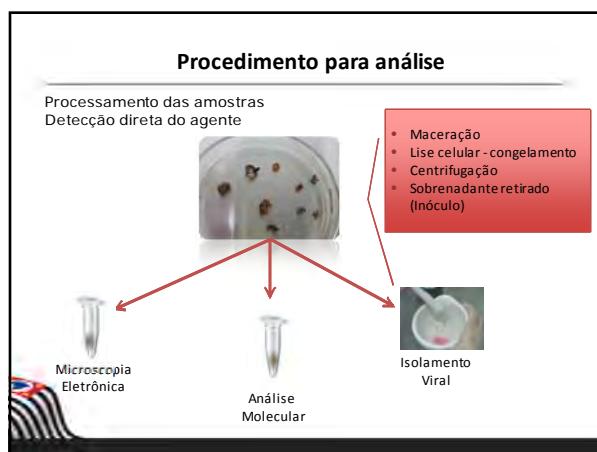
Fonte: Arquivo do Laboratório de Vírus de Bovídeos – Instituto Biológico

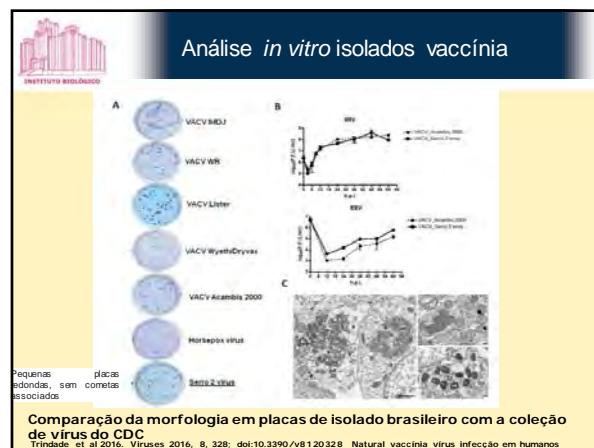
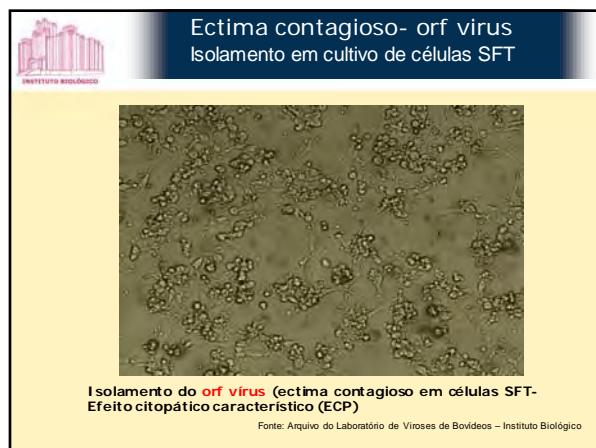


Epitélio e soro





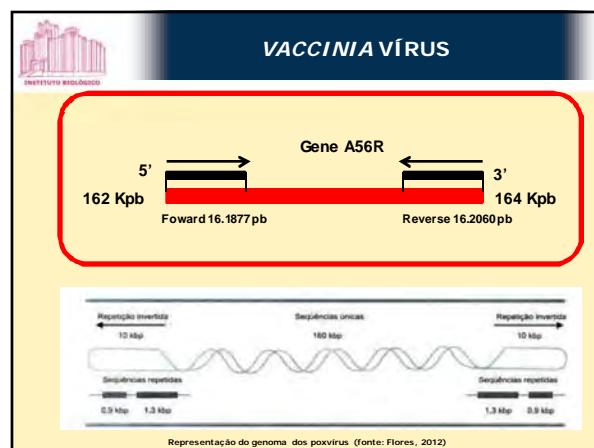
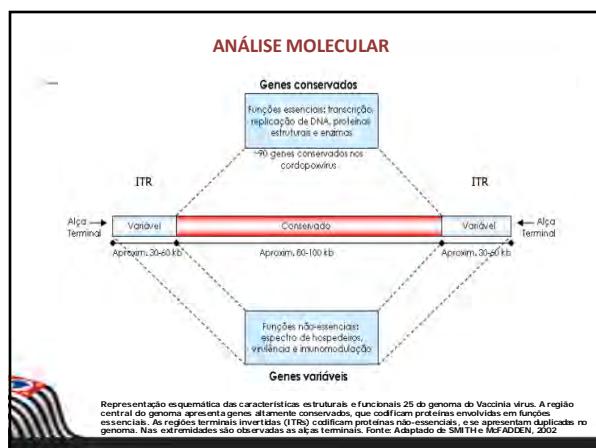




ANÁLISE MOLECULAR

Iniciadores utilizados nas reações de semi-nested PCR para Parapoxvírus

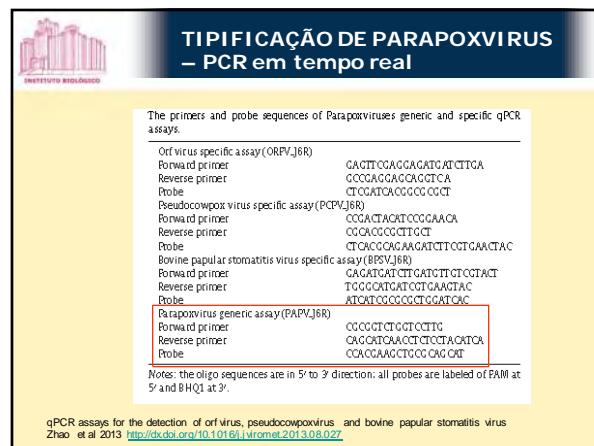
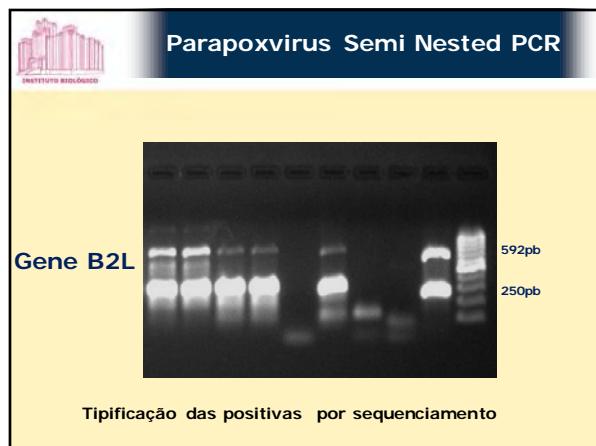
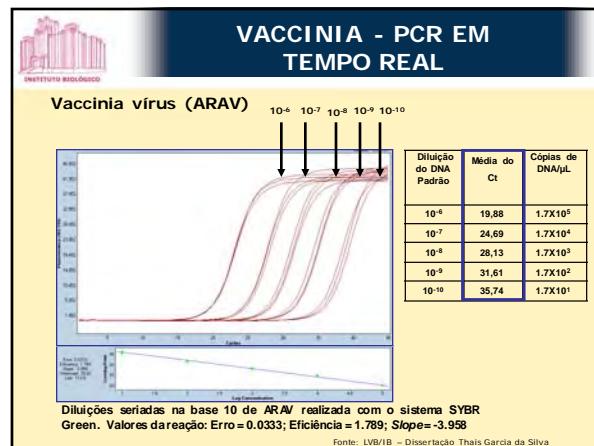
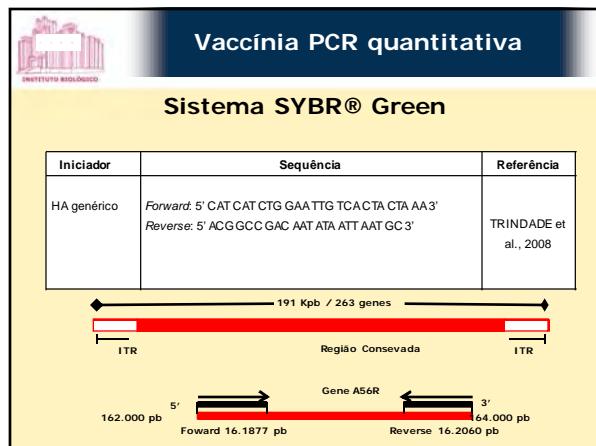
Gênero	Oligonucleotídeo	Sequência	Tamanho do amplicon	Referência
Parapoxvírus	PPP-1	5' GTC GTC CAC GAT GAG CAG CT 3'	594 pb (1ª amplificação)	Inoshima, Morooka, Sentsui (2000)
	PPP-4	5' GCG AGT CGG AGA AGA ATA CG 3'	235 pb	
	PPP-3	5' TAC GTG GGA AGC GCC TGG CT 3'		
	PPP-4	5' GCG AGT CGG AGA AGA ATA CG 3'	235 pb (2ª amplificação)	
Orthopoxvírus	EACP 1	5' ATG ACA CGA TTG CCA ATA C 3'	900 pb (1ª amplificação)	Damaso et al. (2007)
	EACP 2	5' CTA GAC TTT GTT TTC TG 3'		
	HA 80F	5' TAC GTG GGA AGC CCC TG CT 3'	846 pb (2ª amplificação)	
	EACP 2	5' CTA GAC TTT GTT TTC TG 3'		

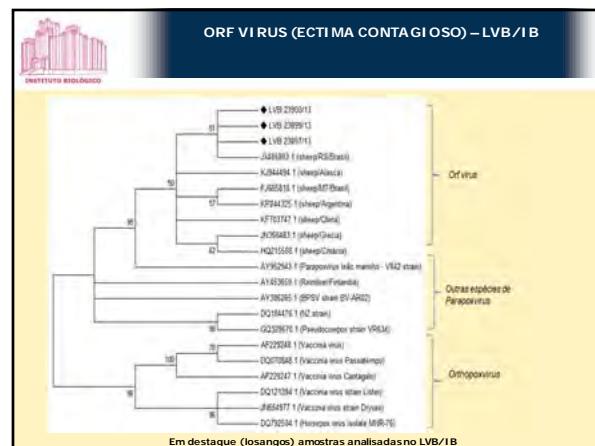
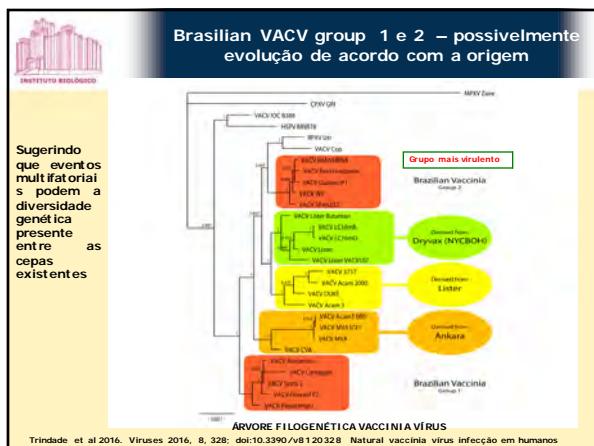
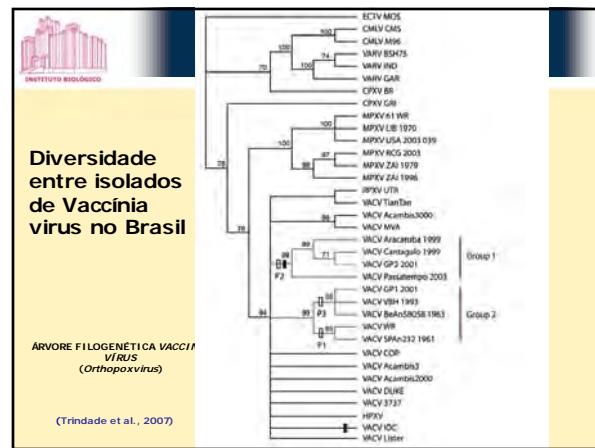
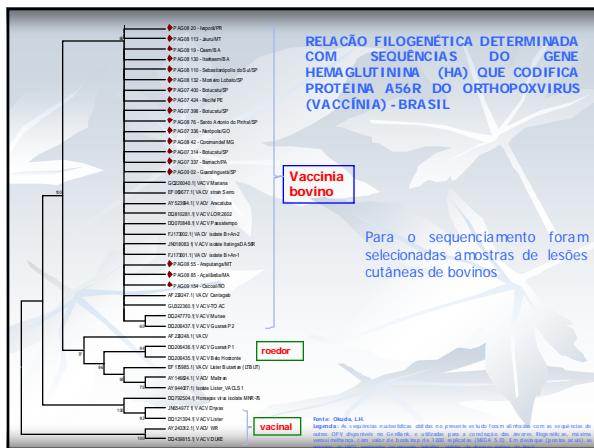
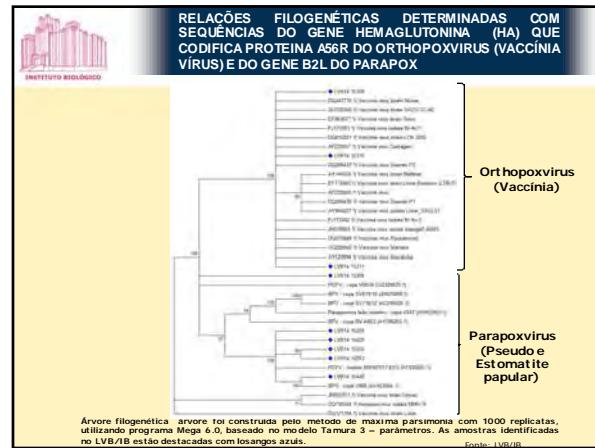
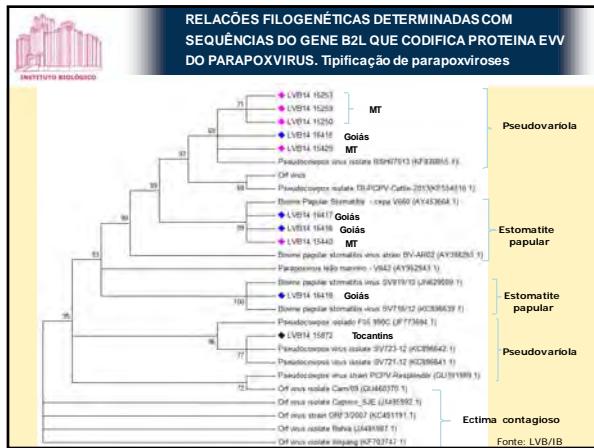


Semi-Nested PCR

Dois ciclos de amplificação do gene HA *orthopoxvirus*

Amplicação	Iniciador	Sequência	Tamanho do amplicon (pb)	Referência
1º	EACP1 f EACP2 r	5'-ATGACACGATTGCCAACATC-3' 5'-CTAGACTTTCTG-3'	950 pb	ROPP et al., 1995
2º	EACP2 r HA80F f	5'-CTAGACTTTCTG-3' 5'-GGTGTATGCAACTATATC-3'	850 pb	DAMASO et al., 2000







PCR e sequenciamento genético

Epidemiologia molecular permite investigar a origem e a história natural dos vírus



Detecção de anticorpos

Vírus neutralização

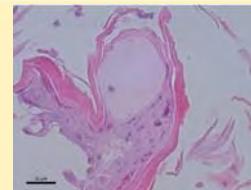
Utiliza-se vírus isolados no Brasil

- Vacinínia vírus: ARAV – isolado brasileiro
- Orfvírus: ATCC VR-1548
- Vírus da pseudovariola: ATCC VR- 634



Biópsia do plano nasolabial ovino Lesões causadas por ORF vírus diferentes fases

Degeneração balonosa (seta branca) e inclusão intracitoplasmática eosinofílica (seta azul) nos queratinócitos localizados no estrato espinhoso da epiderme (Coloração hematoxilina eosina, aumento 630x).



Vesícula localizada no estrato espinhoso da epiderme (seta branca). Ainda observam-se algumas inclusões intracitoplasmáticas eosinofílicas no citoplasma do queratinocito do estrato espinhoso superficial (seta azul) (coloração hematoxilina eosina, aumento 630x).



Biópsia do plano nasolabial ovino Lesões causadas por ORF vírus diferentes fases

Pústula localizada no estrato espinhoso da epiderme. Intenso infiltrado neutrófilico (coloração hematoxilina eosina, aumento 400x).

Crosta formada por tecido necrosado intensamente infiltrado por neutrófilos e exsudato (coloração hematoxilina eosina, aumento 400x).



SAÚDE PÚBLICA

- Se tornou preocupação
- População susceptível (há mais de 30 anos cessou a vacinação contra varíola)
- Atinge principalmente a população rural



Vacinas recombinantes

Vaccinia vírus - Vetor viral recombinante

- Durante a década de 1980, VACV foi utilizado na construção de vetores de expressão e vacinas recombinantes.

Vacinas recombinantes para câncer e doenças infecciosas



Vacinas recombinantes

Na última década, os receios da reintrodução de varíola, reemergência de poxvírus zoonóticos têm motivado pesquisas de poxvírus e desenvolvimento de vacinas e antivirais



BIBLIOGRAFIA

- - CDC, Centro de Controle de Doenças. Disponível em <<http://www.cdc.gov>> acesso em 22 de Outubro de 2007.
- - COETER, J.A.W., et al. Infectious Disease of Livestock. Oxford University Press, Oxford, 1997.
- - DAMASO, C.R.A.; ESPOSTO, J.J.; CONDIR, R.C.; MOUSSA TCHPE, N. Na Emergeant Poxvirus from Humans and Cattle in Rio de Janeiro State: Cantagalo Virus May Derive from Brazilian Smallpox Vaccine. *Virology*, v.277, 2000. p.439-49.
- - FENNER, F.J. Adventures With Poxviruses of Veterbrates. *FEMS Microbiology Review*, n.26, p.123-33, 2000.
- - FENNER, F.J. *Poxviridae In: Veterinary Virology*. 2nd Ed., Academic Press, San Diego, California, 1993.
- - Instituto de Pesquisa para Virologia e Biomedicina da Universidade de Viena. Disponível em <<http://www.vu-wien.ac.at/I123/vironet062005/index.htm>> acesso em 20 de Outubro de 2007.
- - LEITE, J.A.; DRUMOND, B.P.; TRINDADE, G.S.; et al. Passatempo Virus, a Vaccinia Strain, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v.11, n.12, p.1935-38, Dezembro, 2005.
- - LEVIN, N.A. Cowpox Infection, Human. eMedicine.com Inc., Omaha, Nebraska, 2007.
- - LOMBARD, M.; PASTORET, P.P.; MOULIN, A.M. A Brief Histories of Vaccines and Vaccination. *Scientific Technical Review*, v.26, n.1, p.29-48, 2007.
- - MARTINA, B.E.E.; van DOORNUM, G.; DORRESTEIN, et al. Cowpox Virus Transmission from Rats to Monkeys, the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases*, v.12, n.6, p.1005-7, Junho, 2006.



BIBLIOGRAFIA

- - MARTINS, R.A. Contágio – História da Prevenção das Doenças Transmissíveis. 2nd edição, Editora Moderna, São Paulo, São Paulo, 1997.
- - Medaglia, M. L. G.; Moussatché, N.; Nitsche, A.; Dabrowski, P. W.; Li, Y.; Damoh, I. K.; Lucas, C. G. O.; Arruda, L. B.; Damaso, C. R. Genomic analysis, phenotype, and virulence of the historical Brazilian smallpox 2 vaccine strain IOC: Implications for the origins and evolutionary relationships of 3 vaccinia virus strains. *Virology*, v.296, n.1, p.103-11, Abril, 2002.
- - NI EDRIG, M.; MEYER, H.; PANNING, M.; DROSTEN, C. Follow-Up on Diagnostic Proficiency of Laboratories Equipped To Perform Orthopoxvirus Detection and Quantification by PCR: The Second International External Quality Assurance Study. *Journal of Clinical Microbiology*, p.1283-7, Abril, 2002.
- - OIE, Organização Mundial de Saúde Animal. Disponível em <<http://www.oie.int/>>. Acesso em 20 de Outubro de 2013.
- - PELKONEN, P.M.; TARVAINEN, K.; HYNNINEN, A.; et al. Cowpox with Severe Generalized Eruption, Finland. *Emerging Infectious Diseases*, v.9, n.11, p.155-60, November, 2003.
- - SUGAHARA, T.K.N.; KISIELIUS, J.J.; ITO, M.U.; et al. Human vaccinia-like virus infection, Brazil. São Paulo and Goiás states, Brazil: Virus detection, isolation and identification. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.6, n. 46, p. 315-22, 2004.
- - TRINDADE, G.S.; FONSECA, F.G.; MARQUES, J.T. Araçatuba Virus: A Vaccinalike Virus Associated with Infection in Humans and Cattle. *Emerging Infectious Diseases*, v.9, n.2, p.155-60, Fevereiro, 2003.
- - WOLFS, J.F.W.; WAGENARI, A.; NIESTERS, H.G.; OSTERHAUS, A.D.M.E. Rapid and Sensitive Detection of Cowpox Virus Infection. *Emerging Infectious Diseases*, v.8, n.12, p.1495-6, Dezembro, 2002.



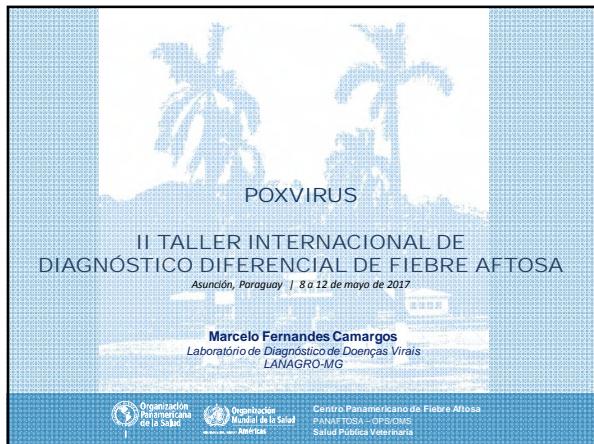
OBRIGADA



www.paho.org/panaftosa



Twitter/panaftosa_inf Facebook/kmcPANAFTOSA

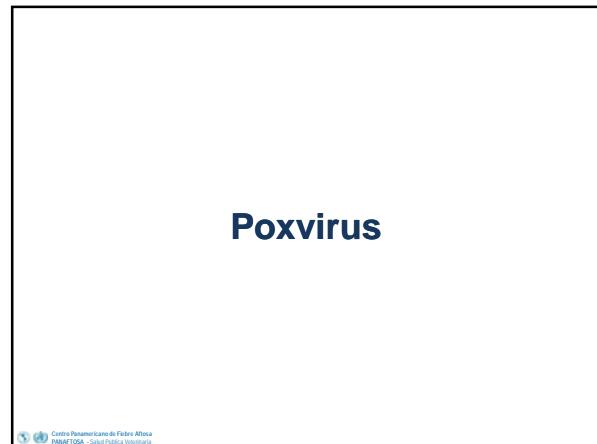


Poxvirus

Parapoxvirus
Detecção clínica (FORM-IN)

- Mais acometidos: < 24 meses;
- Epitélio lingual com lesão circular com bordas elevadas na região inferior da língua;
- Lesões na face ventral da língua com 0,5-3 cm de diâmetro e formato irregular;
- Lesões cicatriciais (tecido fibroso) na face ventral da língua, circular;
- Lesões únicas ou múltiplas;

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOZA - Salud Pública Veterinaria



Parapoxvirus
Detecção clínica (FORM-IN)

- Vesícula íntegra embaixo da língua e gengiva;
- Vesículas rompidas com formato arredondado e bordas definidas;
- Mucosa oral e palato duro;
- > 41 °C em alguns animais;
- Estresse (transporte, desnutrição);
- Curso: 10 dias.

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOZA - Salud Pública Veterinaria

Parapoxvirus
Detecção clínica (FORM-IN)

- Lesões ulcerativas em focinho, lábios, gengivas e casco;
- Lesões arredondadas na parte caudo-lateral da língua;
- Feridas circulares no espaço interdigital e na parte superior da pata;
- Língua descamando;
- Sialorréia, apatia, pelos arrepiados, óbito.

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOZA - Salud Pública Veterinaria

Parapoxvirus
Detecção clínica (FORM-IN)

- Ectima contagioso: crostas ao redor da boca e orelhas.

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOZA - Salud Pública Veterinaria

Parapoxvirus Detecção clínica



Centro Panamericano de Febre Amarela
PAFFA - Saúde Pública Veterinária

Parapoxvirus Detecção clínica



Centro Panamericano de Febre Amarela
PAFFA - Saúde Pública Veterinária

Parapoxvirus Detecção clínica



Centro Panamericano de Febre Amarela
PAFFA - Saúde Pública Veterinária

Parapoxvirus Detecção clínica



Centro Panamericano de Febre Amarela
PAFFA - Saúde Pública Veterinária

Parapoxvirus Detecção clínica



Centro Panamericano de Febre Amarela
PAFFA - Saúde Pública Veterinária

Parapoxvirus Detecção clínica



Centro Panamericano de Febre Amarela
PAFFA - Saúde Pública Veterinária

Parapoxvirus Detecção clínica



Centro Panamericano de Febre Amarela
PAFFA - Saúde Pública Veterinária

Parapoxvirus Detecção clínica



Centro Panamericano de Febre Amarela
PAFFA - Saúde Pública Veterinária

Ectima contagioso Detecção clínica



Centro Panamericano de Febre Amarela
PAFFA - Saúde Pública Veterinária

Ectima contagioso Detecção clínica



Centro Panamericano de Febre Amarela
PAFFA - Saúde Pública Veterinária

Ectima contagioso Detecção clínica

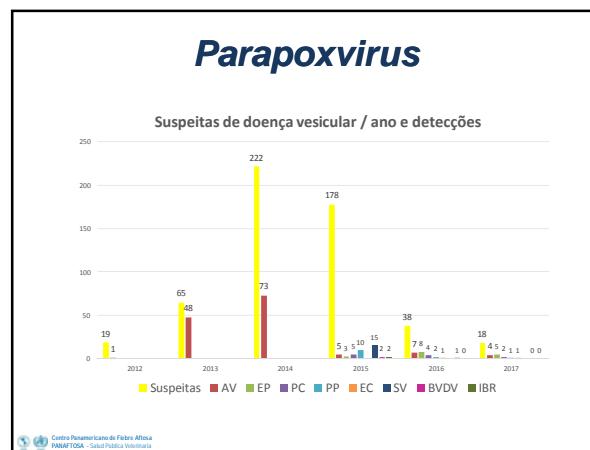
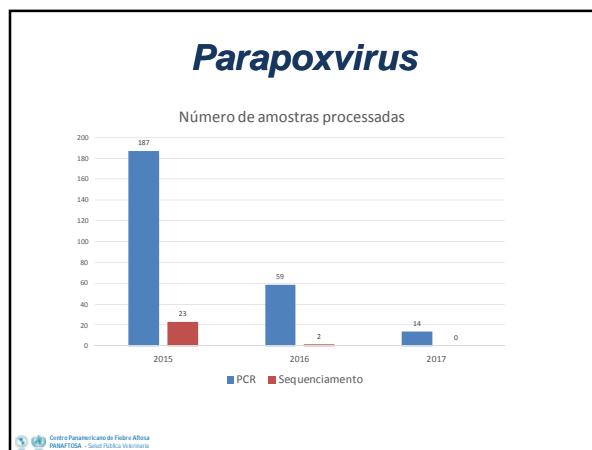


Centro Panamericano de Febre Amarela
PAFFA - Saúde Pública Veterinária

Ectima contagioso Detecção clínica



Centro Panamericano de Febre Amarela
PAFFA - Saúde Pública Veterinária



Parapoxvirus

- Diagnóstico laboratorial
 - Amostras recebidas: epitélio, suave, líquido vesicular e soro;
 - Isolamento de vírus:
 - HeLa, VERO, cultivos primários de rim e testículo ovino e bovino, fibroblastos de galinhas e patos. Células de testículo de cordeiros (primário) – a partir da 4^a. Passagem ([virusdisease](#), 2015 Jun; 26(1-2): 82–88.)

Centro Panamericano de Febre Amarela
PAHO/WHO - Saúde Pública e Emergências

Parapoxvirus

- Diagnóstico laboratorial
 - Estomatite papular: BT, cultivo de rim de fetos bovinos
 - Pseudocowpox: cultivos primários de células de testículo bovino.

Centro Panamericano de Febre Amarela
PAHO/WHO - Saúde Pública e Emergências

Parapoxvirus

Diagnóstico laboratorial

- Infecções simples ou múltiplas;
- BVDV / Parapox
- IBR / LA / *Pseudocowpox virus* / *Bovine papular stomatitis virus*
- IBR / *Bovine papular stomatitis virus*
- Em bovinos, búfalos e ovinos (Ectima contagioso).

Centro Panamericano de Febre Amarela
PAHO/WHO - Saúde Pública e Emergências

Parapoxvirus

- Ectima contagioso – Amostra recebida

Centro Panamericano de Febre Amarela
PAHO/WHO - Saúde Pública e Emergências

Parapoxvirus

- Ectima contagioso – Amostra recebida



Centro Panamericano de Febre Aftosa
PANAPFOA - Saúde Pública Veterinária

Orthopoxvirus

Vaccinia virus – Varíola bovina

Crosta e soro

1. Gado de leite
2. Lesões nas mãos dos ordenhadores
3. Ocorrência prévia na região
4. Lesões nas tetas e em bezerros no focinho
5. Ausência de lesões orais e podais em animais adultos
6. Ausência de lesões orais e podais em equídeos

Centro Panamericano de Febre Aftosa
PANAPFOA - Saúde Pública Veterinária

Vaccinia virus – Varíola bovina

DIAGNÓSTICO CLÍNICO

- Úlceras nos tetos e úberes das vacas em lactação;
- Cicatrização em diferentes estágios;
- Úlceras na boca e focinho dos bezerros;
- Diâmetro variável;
- Ordenhadores com feridas nas mãos e febre alta.

Centro Panamericano de Febre Aftosa
PANAPFOA - Saúde Pública Veterinária

Vaccinia virus

Diagnóstico clínico



Centro Panamericano de Febre Aftosa
PANAPFOA - Saúde Pública Veterinária

Vaccinia virus

Diagnóstico clínico



Centro Panamericano de Febre Aftosa
PANAPFOA - Saúde Pública Veterinária

Vaccinia virus

Diagnóstico clínico



Centro Panamericano de Febre Aftosa
PANAPFOA - Saúde Pública Veterinária

Vaccinia virus
Diagnóstico clínico



Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFcosa - Salud Pública Veterinaria

Vaccinia virus
Diagnóstico clínico



Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFcosa - Salud Pública Veterinaria

Vaccinia virus
Diagnóstico clínico



Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFcosa - Salud Pública Veterinaria

Vaccinia virus
Diagnóstico clínico



Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFcosa - Salud Pública Veterinaria

Vaccinia virus
Diagnóstico clínico



Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFcosa - Salud Pública Veterinaria

Vaccinia virus
Diagnóstico clínico



Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFcosa - Salud Pública Veterinaria

Vaccinia virus Diagnóstico laboratorial

Número de amostras processadas por tipo de ensaio

Ano	Isolamento	PCR	Neutralização	Focos
2013	2	0	0	1
2014	9	48	285	13
2015	27	225	108	16
2016	4	49	39	5
2017	0	17	0	0

Centro Panamericano de Fábris Atípicas
PANAFTOXA - Saúde Pública Veterinária

Vaccinia vírus – Varíola bovina

Diagnóstico laboratorial

- Isolamento de vírus: VERO
- PCR
- Neutralização viral – está em fase de verificação de desempenho:
 - Placa de 24 poços;
 - 400 µL de células (500.000 cél/mL);
 - 24 horas incubação;
 - Ponto de corte 20 ou 40 (250 µL) + 12 a 41 UFP cepa WR (250 µL) durante 1 hora a 37°C;

Centro Panamericano de Fábris Atípicas
PANAFTOXA - Saúde Pública Veterinária

Vaccinia virus – Varíola bovina

Diagnóstico laboratorial

- 400 µL >>> células;
- Incubar por 48 horas;
- CV + CC;
- Descartar o meio;
- Fixar com PBS com formol 10 % - 30 min.;
- Descartar;
- Corar com cristal violeta a 1 % - 30 min.;
- Lavar com PBS / secar
- Contagem da UFP;
- Soro reagente quando houver + 50 % de redução UFP quando comparado com o CV.

Centro Panamericano de Fábris Atípicas
PANAFTOXA - Saúde Pública Veterinária

Vaccinia virus – Varíola bovina

A

Centro Panamericano de Fábris Atípicas
PANAFTOXA - Saúde Pública Veterinária

Vaccinia virus – Varíola bovina

Centro Panamericano de Fábris Atípicas
PANAFTOXA - Saúde Pública Veterinária

Vaccinia vírus – Varíola bovina

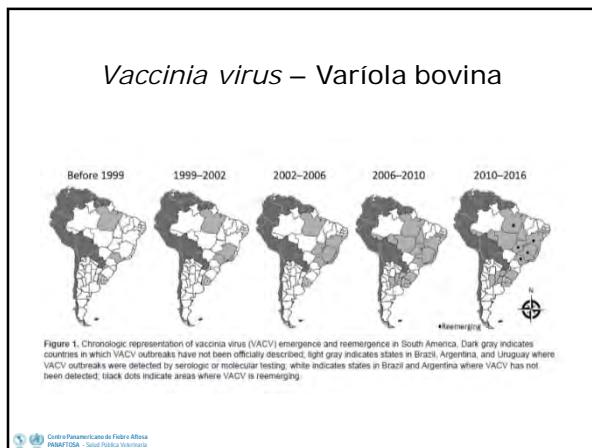
Diagnóstico laboratorial

- PCR: Infecções simples ou associadas com *Parapoxvirus*

Detection of Vaccinia Virus in Dairy Cattle Serum Samples from 2009, Uruguay
Emerging Infectious Diseases • www.cdc.gov/eid • Vol. 22, No. 12, December 2016

Spread of Vaccinia Virus to Cattle Herds, Argentina, 2011
Emerging Infectious Diseases • www.cdc.gov/eid • Vol. 20, No. 9, September 2014

Centro Panamericano de Fábris Atípicas
PANAFTOXA - Saúde Pública Veterinária

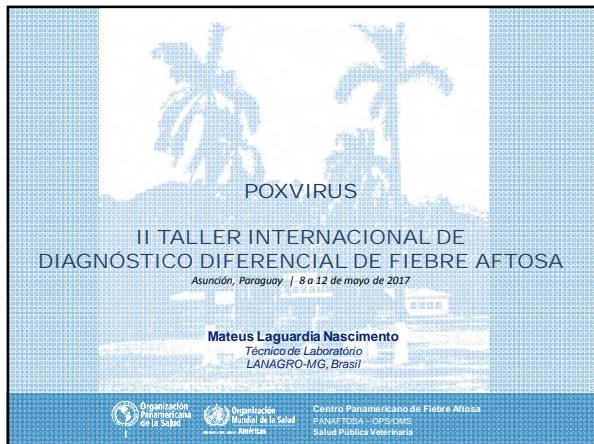


www.paho.org/panaftosa



marcelo.camargos@agricultura.gov.br

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PAFFA - Centro de Referencia



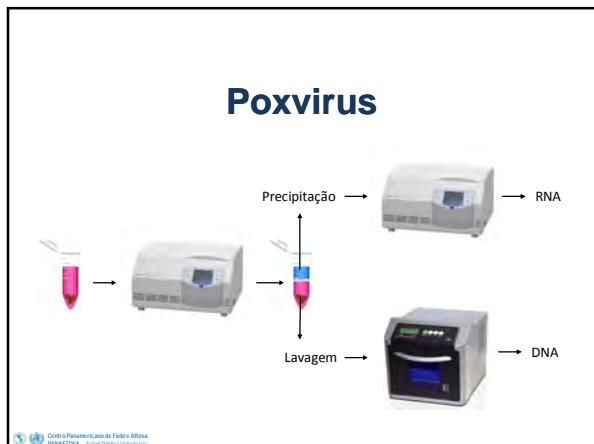
Poxvirus

- Poxvirus

- Diagnóstico diferencial de Febre Aftosa

- Orthopoxvirus e Parapoxvirus
 - Vaccinia virus (VACV)
 - Estomatite Papular (BSPV)
 - Pseucowpox (PCPV)
 - Orf Virus (ORFV)

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOZA - Salud Pública Veterinaria

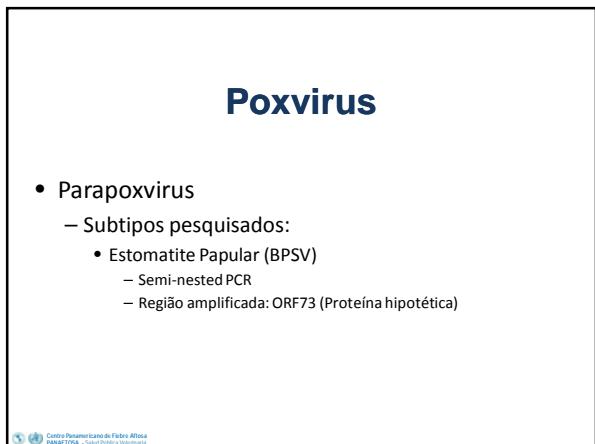
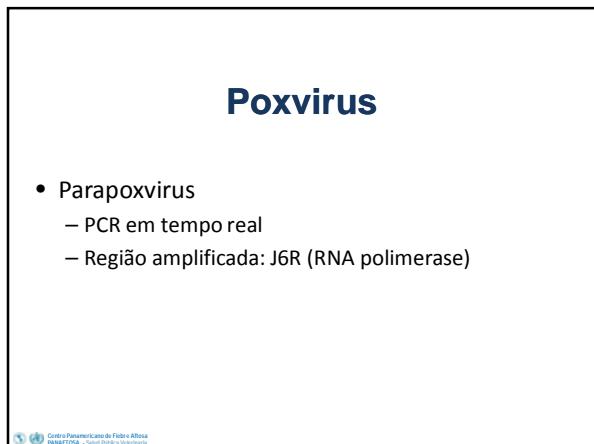


Poxvirus

- Orthopoxvirus

- PCR em tempo real
- Região amplificada: Hemaglutinina

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOZA - Salud Pública Veterinaria



- Parapoxvirus

- PCR em tempo real
- Região amplificada: J6R (RNA polimerase)

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOZA - Salud Pública Veterinaria

- Parapoxvirus

- Subtipos pesquisados:
 - Estomatite Papular (BPSV)
 - Semi-nested PCR
 - Região amplificada: ORF73 (Proteína hipotética)

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOZA - Salud Pública Veterinaria

Poxvirus

- Parapoxvirus

- Subtipos pesquisados:

- Pseudocowpox (PCPV)
 - Semi-nested PCR
 - Região amplificada: ORF129 (Anquirina)

 Centro Panamericano de Febre Amarela
CPFA/FIOCRUZ - Saúde Pública e Inovação

Poxvirus

- Parapoxvirus

- Subtipos pesquisados:

- Orf Virus (ORFV)
 - PCR em Tempo Real
 - Região amplificada: J6R (RNA polimerase)

 Centro Panamericano de Febre Amarela
CPFA/FIOCRUZ - Saúde Pública e Inovação

Poxvirus

- Casos curiosos

- Coinfecção

- Não é raro encontrar, principalmente regiões endêmicas, animais infectados por dois ou mais vírus desta família
 - BPSV/PCPV
 - BPSV/VACV
 - PCPV/VACV

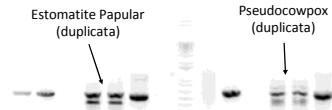
 Centro Panamericano de Febre Amarela
CPFA/FIOCRUZ - Saúde Pública e Inovação

Poxvirus

- Casos curiosos:

- Coinfecção

- 2016, confirmado por sequenciamento



 Centro Panamericano de Febre Amarela
CPFA/FIOCRUZ - Saúde Pública e Inovação

Poxvirus

- Entre 2015 e 2016:

- 35 focos positivos para Poxvirus
 - VACV, ORFV, BPSV e/ou PCPV

- Confirmados por sequenciamento

Foco	Cidade	Mês	Ano
001	---	---	---
002	---	---	---
003	---	---	---
004	---	---	---
005	---	---	---
006	---	---	---
007	---	---	---
008	---	---	---
009	---	---	---
010	---	---	---
011	---	---	---
012	---	---	---
013	---	---	---
014	---	---	---
015	---	---	---
016	---	---	---
017	---	---	---
018	---	---	---
019	---	---	---
020	---	---	---
021	---	---	---
022	---	---	---
023	---	---	---
024	---	---	---
025	---	---	---
026	---	---	---
027	---	---	---
028	---	---	---
029	---	---	---
030	---	---	---
031	---	---	---
032	---	---	---
033	---	---	---
034	---	---	---
035	---	---	---

*Somente casos comprovados e confirmados

 Centro Panamericano de Febre Amarela
CPFA/FIOCRUZ - Saúde Pública e Inovação

Poxvirus



 Centro Panamericano de Febre Amarela
CPFA/FIOCRUZ - Saúde Pública e Inovação

Poxvirus

- Casos curiosos
 - Coinfecção

Spread of Poxvirus in livestock in Brazil associated with cases of double and triple infection

Mateus Laguardia-Nascimento¹, Ana Paula Ferreira de Oliveira¹, Isabela Carlini Azevedo¹, Anselmo Vasconcelos Ribeiro Júnior², Marcelo Fernandes Camargo³, Antônio Augusto Fonseca Júnior^{2*}

¹ Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais, Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brazil

² Centro Panamericano de Febre Amarela
LANAGRO - Centro de Pesquisa e Inovação

Poxvirus

- Casos Curiosos
 - 2016, confirmado por sequenciamento

No.	Colour Name	Type	Ct
1	LDV-2016-388-00	LDDV	22.41
2	Cx (Meioin)	Cx (Poxv)	18.03
3	BR	BR	18.53

**Centro Panamericano de Febre Amarela
LANAGRO - Centro de Pesquisa e Inovação**

Poxvirus

- Tipificação

No.	Colour Name	Ct	Rep.	Ct
1	LDV-2016-388-00	21.18	21.16	
2	Cx (Meioin)	15.28	15.28	
3	BR			

**Centro Panamericano de Febre Amarela
LANAGRO - Centro de Pesquisa e Inovação**

Poxvirus

- Casos curiosos
 - Infecção de um bubalino por PCPV em 2016

Detection of multiple viral infections in cattle and buffalo with suspected vesicular disease in Brazil

Mateus Laguardia-Nascimento, Érika Basso Sales, Marcella Ribeiro Gasparini, Natália Mendes de Souza, Jússica Aparecida Gonçalves da Silva, Giovânia Gonçalves Souza, Fernanda Rock Carvalho, Alyane Figueiredo dos Santos, Anselmo Vasconcelos Ribeiro Júnior, Marcelo Fernandes Camargo, Antônio Augusto Fonseca Júnior*

**Centro Panamericano de Febre Amarela
LANAGRO - Centro de Pesquisa e Inovação**

Poxvirus

- Casos curiosos
 - Segundo caso, também em 2016, agora em SP

VETERINARY QUARTERLY, 2016
VOL. 37, NO. 1-16-22
<http://dx.doi.org/10.1080/01611232.2016.1232479>

SHORT COMMUNICATION

Detection of pseudocowpox virus in water buffalo (*Bubalus bubalis*) with vesicular disease in the state of São Paulo, Brazil, in 2016

Mateus Laguardia-Nascimento¹, Ana Paula Ferreira de Oliveira¹, Fernanda Rodas Pires Fernandes², Anselmo Vasconcelos Ribeiro Júnior³, Marcelo Fernandes Camargo³, and Antônio Augusto Fonseca Júnior

¹Laboratório de Biologia Molecular, Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais, Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brasil;
²Laboratório de Diagnóstico de Doenças Virais, Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais, Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brasil;

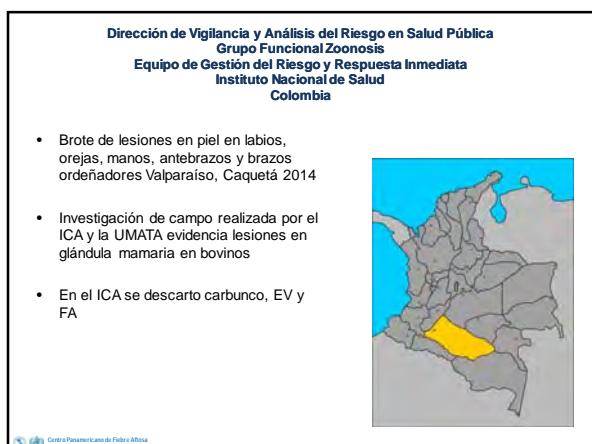
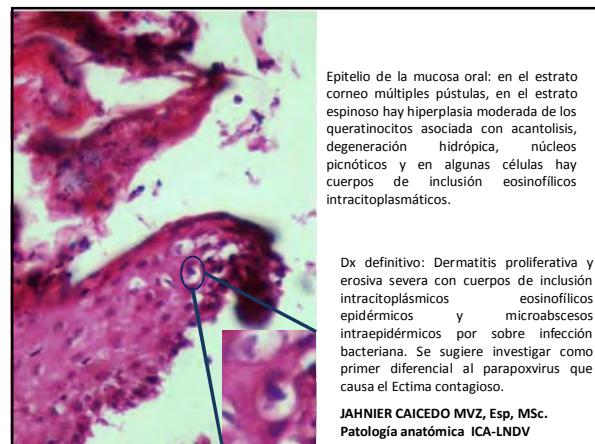
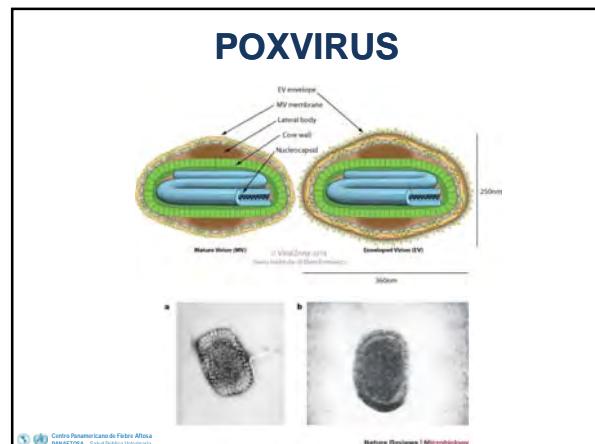
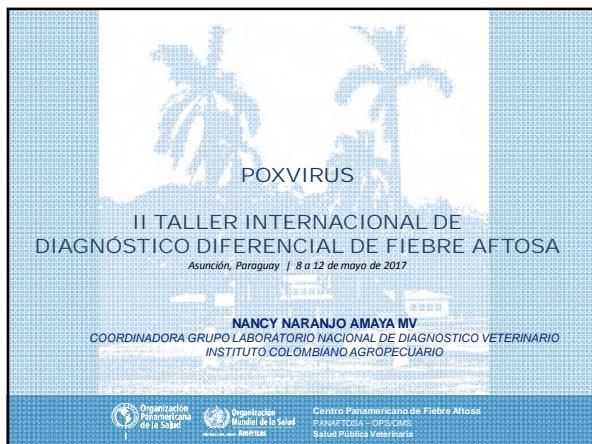
**Centro Panamericano de Febre Amarela
LANAGRO - Centro de Pesquisa e Inovação**

Poxvirus

- Trabalhos recentes de pesquisa desenvolvidos no LANAGRO-MG envolvendo os Poxvirus
 - “Padronização e validação de método PCR em tempo real para o diagnóstico diferencial de Pseudo cowpox em bovinos” – Mestrado Érika Passos

mateus.nascimento@agricultura.gov.br

**Centro Panamericano de Febre Amarela
LANAGRO - Centro de Pesquisa e Inovação**



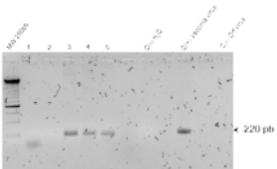


- Se realizaron reuniones con el ICA para identificar la afectación en animales.
- Se solicitó apoyo al laboratorio de virología del INS para establecer e diagnóstico.
- Se consideró como diagnósticos probables pseudoviruela (nódulo del ordeñador), estomatitis vesicular, ectima contagioso, Orf.

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOSA - Salud Pública Veterinaria

RESULTADOS

- Se obtuvieron muestras de sangre y de la lesión.
- Se identificaron anticuerpos IgG e IgM para Orthopoxvirus (3) se aisló *Vaccinia virus*.
- En un paciente se encontraron anticuerpos IgG anti Orthopoxvirus, se atribuyó infección a *Pseudocowpox* virus.



Fotografías laboratorio de virología
INS

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOSA - Salud Pública Veterinaria

INS - CDC



- Consultoría CDC 2015.
- ICA aporta muestras de epitelios con resultado negativo a FA y EV.
- Se detectó Poxvirus en algunas muestras del departamento de caldas.
- ICA acompañó a profesionales del CDC e INS a los predios en donde se detectó Poxvirus.
- CDC dejó el protocolo y una pequeña cantidad de reactivos para PCR.

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOSA - Salud Pública Veterinaria

DIFICULTADES DIAGNOSTICO

- No controles
- No hay presupuesto suficiente para adquisición de reactivos.
- No cuenta con personal suficiente (7 profesionales que no son de dedicación exclusiva para vesiculares)

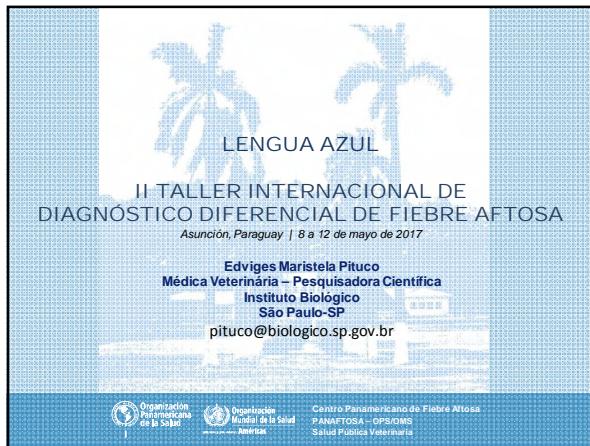
Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOSA - Salud Pública Veterinaria

www.paho.org/panaftosa

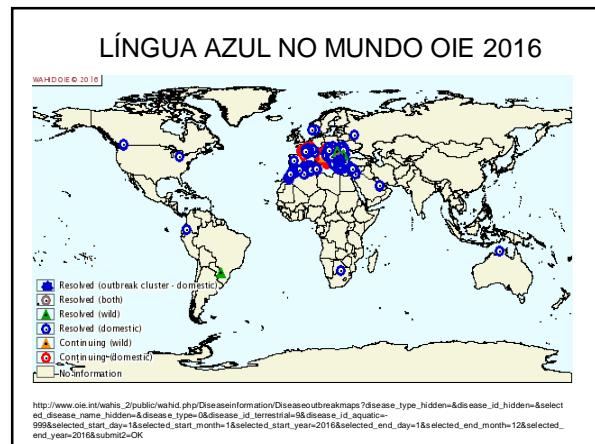


Twitter/[panaftosa_inf](#) Facebook/[kmcPANAFTOSA](#)

LENGUA AZUL



LÍNGUA AZUL NO MUNDO	
Doença emergente causada por > que 27 sorotipos de BTV	
1876	Primeira descrição da enfermidade - África do Sul "Epizootia catarral das ovelhas"
1902	Etiologia desconhecida - Nome proposto de língua azul – acometimento vasos sanguíneos - hemorragia e clanoze
1940	Descrição da infecção na Índia
1948	Primeira descrição nos USA (sorotipos BTV- 1, 2, 3, 5, 6, 10, 11, 13, 14, 17, 19 e 22)
1956	BTV-10 Sul Europa (Morroco, Espanha, Portugal-17.900 ovinos mortos em 4 meses (75% mortalidade)
1979	BTV-4 na Grécia
1999	Novos sorotipos (BTV-2 e BTV-7) na Austrália. Já haviam sido detectados BTV-1, 3, 7, 9, 15, 16, 20, 21 e 23).
2006	Primeiros surtos no norte da Europa causando sérios prejuízos à pecuária (25% mortalidade em ovelhas - mais de um milhão de ovelhas mortas pela doença). Desde 1998, pelo menos 13 sorotipos do VLA foram detectados na Europa.



Different species of Culicoides vector disseminate different serotypes of BTV in relatively distinct global ecosystems

Culicoides Vector Species	Global Ecosystems	BTV Serotypes
<i>C. sonorensis</i>	North America	1, 2, 10, 31, 13, 17
<i>C. pulicaris</i>	South America	1-5, 6-8, 9-16, 18-25
<i>C. dewitzi</i>	Africa	1-19, 22-24
<i>C. imicola</i>	Africa, Asia	3, 4, 8, 10, 12, 14, 18
<i>C. brevitarsis</i>	Oceania	1-4, 9, 12, 16-21
<i>C. wadili, others?</i>	Oceania	1, 3, 5, 7, 9, 12, 15, 16, 20, 21, 23
<i>C. insignis, others?</i>	South America	1, 3, 6, 8, 12, 14, 15

LÍNGUA AZUL NO BRASIL	
1980	BTV-4, de bovino brasileiro, exportado para EUA, sem manifestação clínica, isolado durante a quarentena naquele país (GROOCOCK; CAMPBELL, 1982)
2001	BTV-12 no Paraná, primeiro surto em ovinos e caprinos (Clavijo et al., 2002)
2009	BTV-12 Rio Grande do Sul: surto em ovinos
2012	BTV-4 Minas gerais: surto em ovinos (Rosa 2014 pág. 58 Anais Simpósio BTV, Roma).
2013 e 2014	BTV-4 e BTV-10 Rio de Janeiro: surto em ovinos.
2014	BTV-1, 4 e 17 Rio Grande do Sul: surto em ovinos - Taxa mortalidade 28,89%.

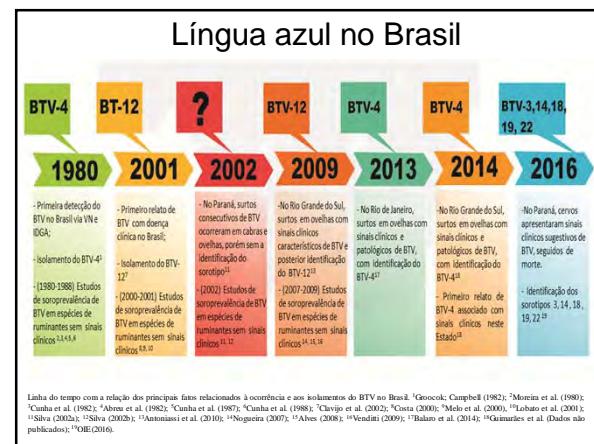
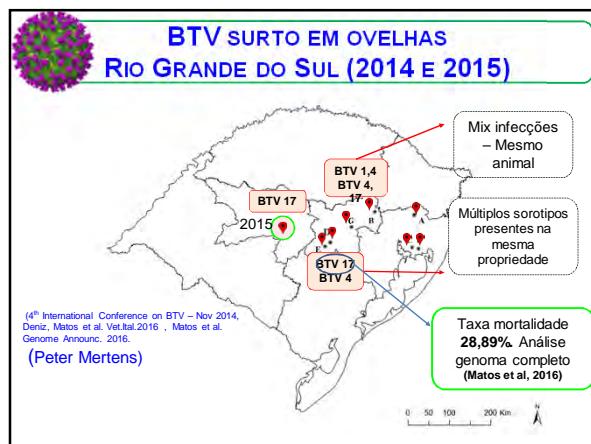
LÍNGUA AZUL NO BRASIL

2014	Detetado em sangue e sêmen de Bovinos os sorotipos BTV-4, 8, 10 e 16 , contudo nenhum animal manifestou sinais clínicos de língua azul (Gasparini 2014 Anais Simpósio BTV, Roma).
2015	Foram notificados ao MAPA casos de BTV em cervídeos (espécie Mazama nana) ocorridos no Refúgio Biológico Bela Vista, Itaiupi Binacional, Foz do Iguaçu, causados pelos sorotipos BTV-3, 14 e 18 .
2016	Foram notificados ao MAPA casos de BTV em cervídeos (espécie Mazama nana) ocorridos no Refúgio Biológico Bela Vista, Itaiupi Binacional, Foz do Iguaçu, causados pelos sorotipos BTV-19 e BTV-22 .

Língua azul no Brasil

Veterinaria Italiana 2015, 51 (6): 257-262 doi: 10.1285/i.vetit.60922892.1
Accepted: 21.07.2015 Available on line: 31.12.2015

Oribivirus isolation and identification in South America (1980-2014). 1 Grocock and Campbell 1982, 2 Clavijo et al. 2002, 3 Gorsch et al. 2002, 4 Attoui et al. 2009, 5 Antoniassi et al. 2010, 6 Favero et al. 2013, 7 Legisa et al. 2013, 8 Balaro et al. 2014, 9 Gasparini et al. unpublished data, 10 Guimaraes et al. unpublished data, 11 Rosa et al. unpublished data, 12 Viarouge et al. 2014.



LÍNGUA AZUL NO BRASIL

Bovinos – sem manifestação clínica, pesquisas evidenciaram os sorotipos BTV-4, BTV-8, BTV-10 e BTV-16, em amostras de sêmen e sangue (GASPARINI et al., 2014).

Ovinos - foram detectados os sorotipos BTV-1, BTV-4, BTV-8, BTV-10 e BTV-17, isoladas a partir de amostras clínicas de diferentes focos da doença ocorridos no Brasil (MATOS et al., 2016; ROSA et al., 2014; BALARO et al., 2014; LIMA 2013; 2013; ROSA et al., 2012).

Cervídeos - O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA, notificou a OIE sobre a ocorrência dos sorotipos BTV-3, BTV-14, BTV-18, BTV-19 e BTV-22 do VLA no Estado do Paraná.

Portanto.....

Focos da doença ocorrem tipicamente quando ovinos suscetíveis são introduzidos em área endêmica ou quando insetos carregam o vírus de uma região endêmica para áreas adjacentes contendo populações suscetíveis.

Doenças de notificação obrigatória - OIE

Imediata: sorotipo identificado pela primeira vez
Relatório semestral ou anual: sorotipos endêmicos

"Enfermidades infecciosas cujas consequências socioeconómicas podem ser graves e de importância sobre o comércio internacional de animais e seus subprodutos".



BLUETONGUE VIRUS (BTV)

Terrestrial Animal Health Code (2016)
CAPÍTULO 8.3
 2016 ©OIE - *Terrestrial Animal Health Code*



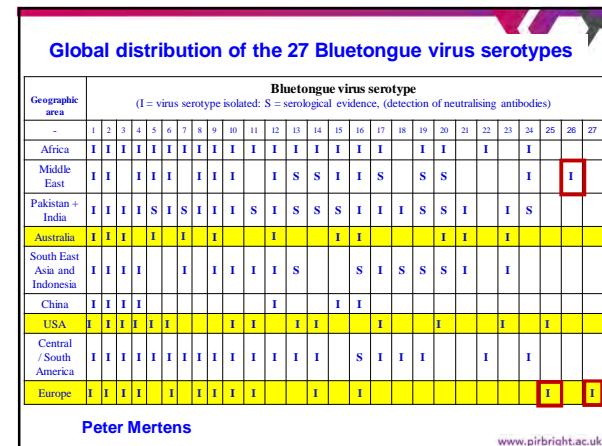
IMPACTO ECONÔMICO DA LA

Restrições impostas por países importadores

- Movimentação de animais – necessidade de certificação que os animais são livres de BTV

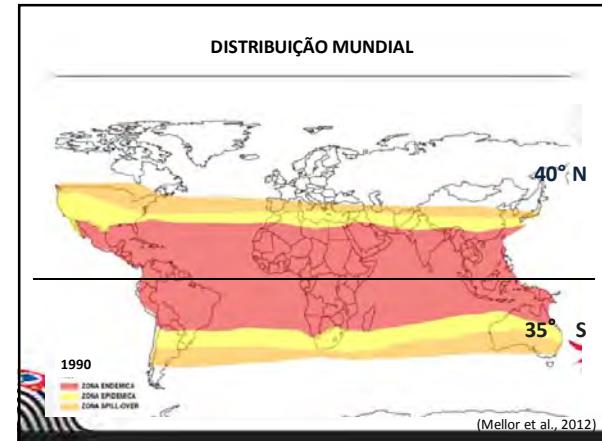
Perdas diretas nos rebanhos afetados (menor produtividade, morte de animais, implementação de medidas controle)

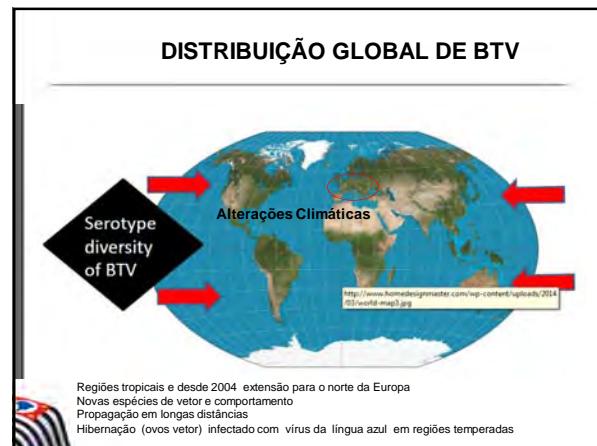
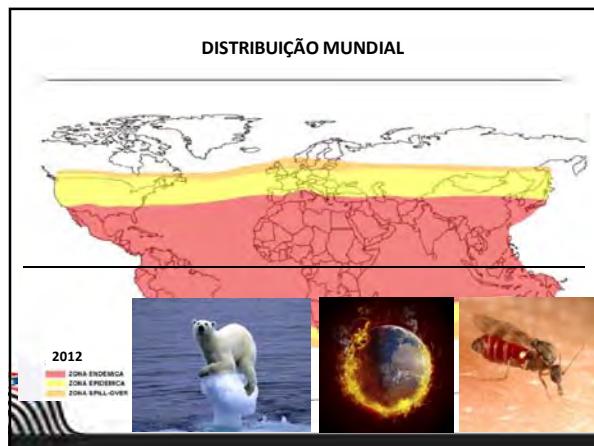
Dificuldade de controle e erradicação uma vez introduzida em país com clima propício ao vetor

A epidemiologia da LA é mundialmente classificada em três zonas de infecção:

- Zona endêmica** - em que a infecção é comum e geralmente subclínica, com a presença de diferentes sorotipos;
- Zona epidêmica** - em que a doença ocorre em intervalos regulares, influenciados pelas condições climáticas, favorecendo a disseminação do vetor;
- Zona incursiva** - em que a doença ocorre esporadicamente, pois as condições climáticas não favorecem a reprodução do vetor, sendo que os surtos que ocorrem nesta zona estão associados ao carreamento do vetor infectado por meio do vento e subsequente reprodução durante o verão, desaparecendo no outono e inverno (OSBURN, 2004; ROY, 2008).

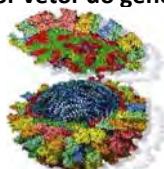


Estudos de epidemiologia molecular têm demonstrado que a recente emergência de LA, no continente europeu, coincide com mudanças climáticas, que aparentemente acarretaram no aumento tanto da distribuição quanto no tamanho das populações dos insetos vetores da região (ROY, 2008).

Na América do Sul, os únicos países que possuem o BTV isolado e identificado por RT-qPCR e sequenciamento de porções do genoma são: Brasil (BTV-4, -12, -3, -14, -18, -19 e -22), Argentina (BTV-4) e mais recentemente Guiana Francesa (BTV-2, -13 e -17) (CLAVIJO et al., 2002; ANTONIASSI et al., 2010; LEGISA et al., 2013; BALARO et al., 2014; VIAROUUGE et al., 2014; OIE, 2016).

Definição de língua azul

Doença infecciosa, podendo ser contagiosa (MAAN et al., 2016), de etiologia viral, transmitida principalmente por vetor do gênero *Culicoides* sp



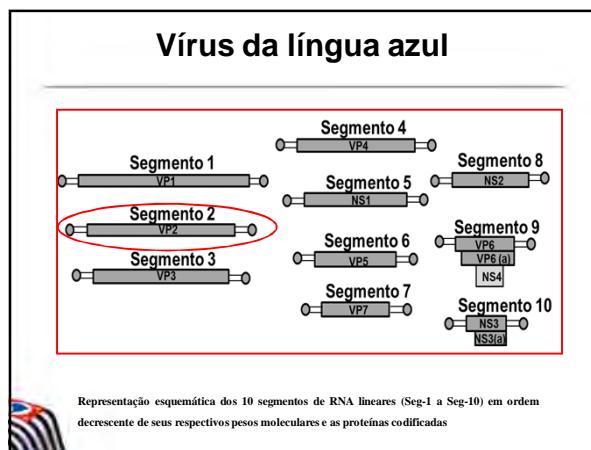
MAAN, S.; MAAN, N. S.; BELAGANAHALLI, M. N.; POTGIETER, C. A.; KUMAR, V.; BATRA, K.; WRIGHT, I. M.; KIRKLAND, P. D.; MERTENS, P. P. C. Development and Evaluation of Real Time RT-PCR Assays for Detection and Typing of Bluetongue Virus. PLOS ONE. DOI: 10.1371/journal.pone.0163014, September, 2016.

Língua azul

- Vírus da Língua Azul
 - Não envelopado
 - Icosaédrico
 - Família *Reoviridae*
 - Gênero *Orbivirus*
 - Genoma viral (18×10^3 kDa)
 - 10 segmentos de RNA fita dupla - favorece rearranjos
 - Sete proteínas estruturais (VP1 a VP7)
 - Três não estruturais (NS1 a NS3)



Fonte:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3137733/bin/queensunvise2_c.jpg



Características dos segmentos genômicos e das proteínas do BTV

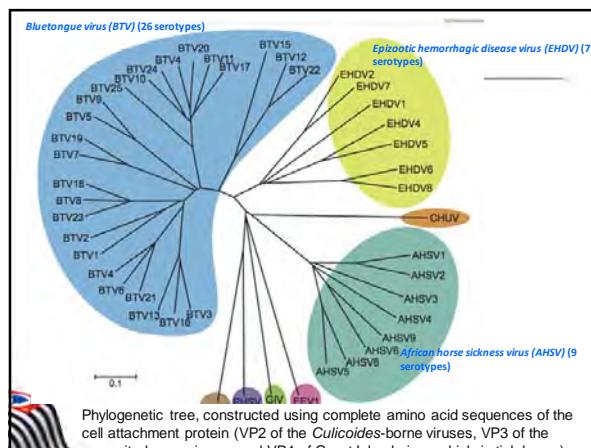
(Mertens et al. (2008) e atualizada)

Segmento Genômico	Tamanho (kpb)	Proteína	Pes. molecular da proteína (kDa)	Localização	Função da proteína na célula
Seg-1	3954	VP1	149	Interior da partícula viral (core)	Polimerase
Seg-2	2926	VP2	111	Capsídeo externo	Proteína de acoplamento, determinação de sorotipos e epitopos
Seg-3	2772	VP3	103	Capsídeo interno	Estrutural
Seg-4	2011	VP4	764	Interior da partícula viral (core)	Enzima que adiciona o cap
Seg-5	1770	NS1	644	Túculo	Movimento intracelular
Seg-6	1639	VP5	591	Capsídeo externo	Peculiaridade viral
Seg-7	1156	VP7	385	Capsídeo intermédio	Proteína de acoplamento a célula de inseto e determinação de sorotípico
Seg-8	1123	NS2	409	Não estrutural	Seleção de RNA
Seg-9	1046	VP6	357	Interior da partícula viral (core)	Helicase
Seg-10	822	NS3/NS3a	256	Não estrutural	Auxílio no egresso das partículas víricas

Língua azul

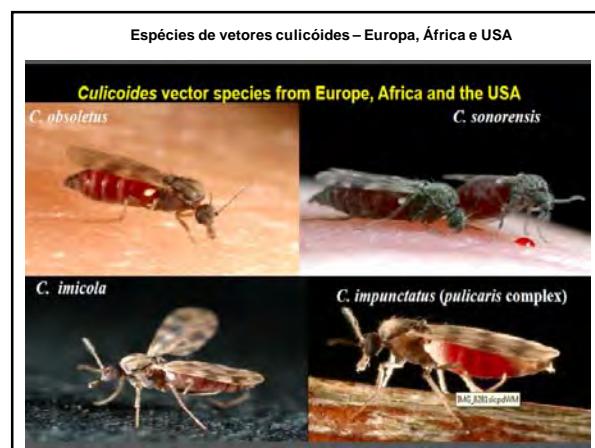
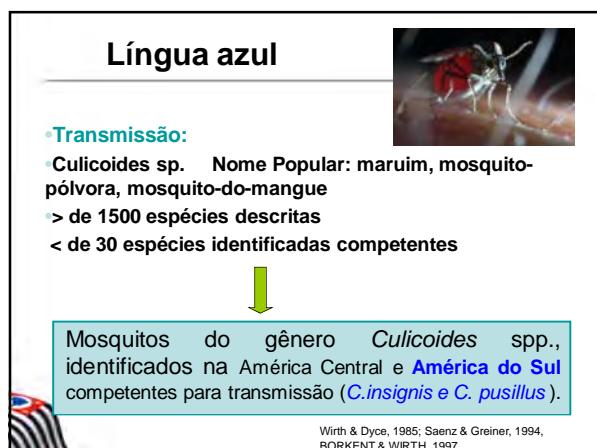
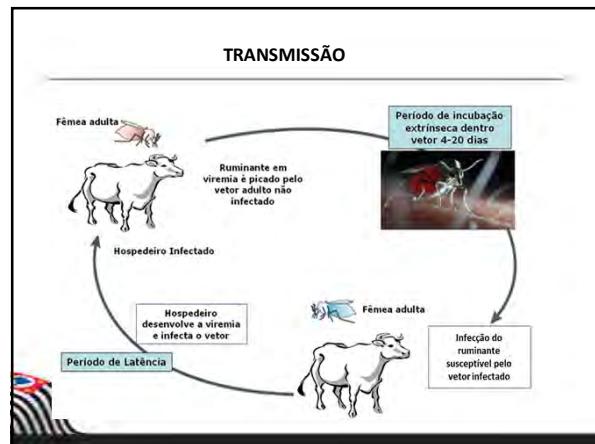
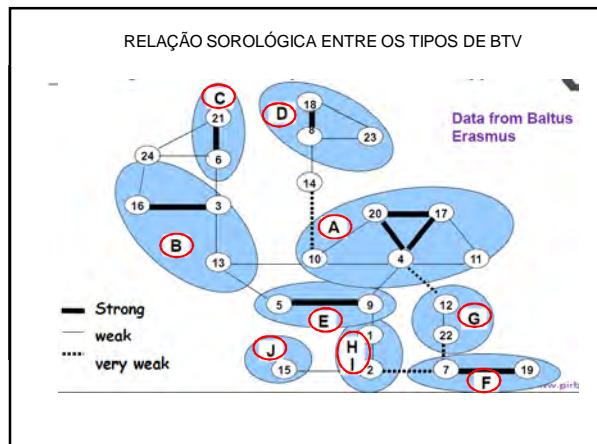
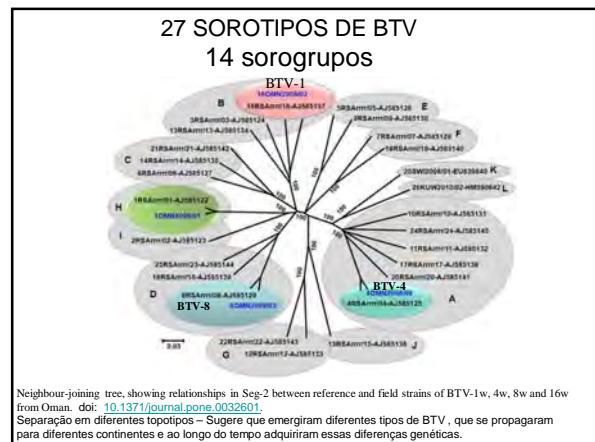
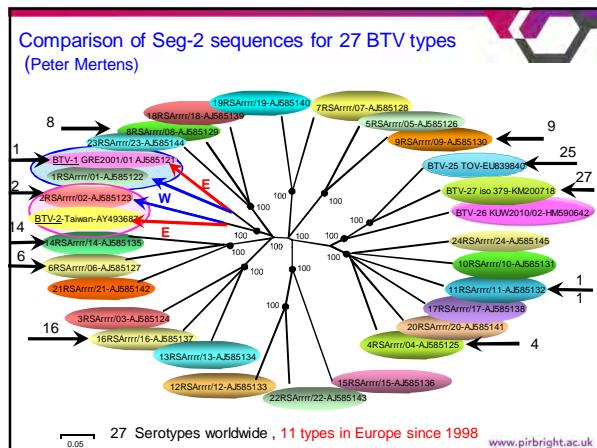
- Mutações pontuais nos diferentes segmentos gênicos do VLA podem alterar a virulência.
- Exemplo: BTV-4 praticamente não causa lesão entre os ruminantes das Américas, em contraste as cepas do mesmo sorotípico no Sul da África induziram 100% de mortalidade em ovinos experimentalmente inoculados (SINGER et al., 2001).
- O BTV-8 não causa doença em bovinos na maioria dos países onde a língua azul é endêmica, entretanto na Europa esse sorotípico produz manifestações clínicas, incluindo problemas reprodutivos em bovinos e ovinos.

ICTV 22 existing Orbivirus species



Língua azul

- Mundialmente descritos 29 sorotípos
 - BTV-1 a BTV-27 – ICTV
 - 02 novos sorotípos (BTV-28 e 29) – Detectados em 2015 na Índia
 - Sorologicamente distintos
 - Pode haver reação cruzada entre sorotípos
 - Há proteção cruzada com estirpes heterólogas?
 - Qual influência na epidemiologia da doença?
- BTV-27 detectado em cabras na França em 2014 - Há evidências de transmissão horizontal – altas concentrações de vírus foi detectado na secreção nasal.



Tolerância a dessecção extrema dos ovos de *C. sonorensis* – evidências da eclosão quando reidratados- perpetuação da infecção em climas temperados

Emily McDermott

Eggs of *C. sonorensis* can withstand extreme desiccation and hatch when rehydrated.

Graph showing Percentage vs Time (h) for % Egg Hatch, % ova eclosidos, and % H₂O Loss.

Time (h)	% Egg Hatch (%)	% ova eclosidos (%)	% H ₂ O Loss (%)
0	100	100	0
12	~60	~55	~15
24	~70	~65	~25
36	~80	~75	~35
48	~85	~80	~40

McDermott and Mullens
J Med Entomol (2014) 51 (6): 1151-1158.

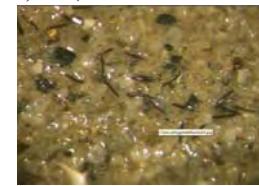
Pouco se conhece sobre a biologia de culicoides

Presentes em áreas quentes, úmidas e alagadas, que são ricas em matéria orgânica e abundante em hospedeiros dos quais os insetos podem se alimentar. O período de atividade do vetor concentra-se ao entardecer e amanhecer (MELLOR et al., 2000)



Culicoides imicola.

Fonte: Rijt et al. (2008).



O ciclo de vida desses insetos tem a duração de duas a seis semanas. Fases: ovo, quatro estágios larvais, pupa e adulto.

As fêmeas se alimentam de sangue 03 a 04 dias antes da postura dos ovos.

Os machos por apresentarem aparelho bucal não apto a sugar sangue, sua alimentação é baseada em sucos vegetais, não sendo atraídos por animais (BIRLEY, BOORMAN, 1982; MELLOR et al., 2000; LYSYK, DANYK, 2007; VERONESI et al., 2009).

No inseto o vírus se replica no trato digestório e em órgãos alvo secundários, incluindo as glândulas salivares.

O intervalo entre a ingestão e a transmissão do vírus é chamado de **período de incubação extrínseco** (EIP) e sua duração depende da temperatura, levando de 04 a 22 dias em temp de 25°C (WELLBY et al., 1996).



Língua azul

Fatores Ambientais:

- Elevados índices de temperatura e umidade aumentam a multiplicação do vetor:
- diminui tempo de eclosão dos ovos ;
- diminui tempo de desenvolvimento das larvas;
- Aumenta população do vetor, propiciando o aumento da atividade (voo e repasto sanguíneo) dos insetos

(BAYLIS, 2000).

Língua azul - Ciclo de vida dos vetores Culicoides.

Ciclo de vida dos Culicoides

Fonte: Adaptado de Nature Reviews - Microbiology (2005)

Outras formas de transmissão da língua azul

- Via sêmen** – Ocorre devido a presença do vírus no sêmen de touros em período virêmico, (sêmen contaminado com sangue).
- Via transplacentária** - depende do sorotipo, cepa do vírus e estado imune da mãe.
- Ovinos - acontece no primeiro trimestre;
- Bovinos - primeiro e segundo trimestre da gestação, com taxa de transmissão variando de 15 a 20% (DARPEL et al., 2009).
- Não há registro no Brasil dessa forma de transmissão, apesar da insistência em detectar o vírus em fetos abortados.
- Contágio (secreções) ???



FATORES DE RISCO

- Dependentes do Hospedeiro**
 - Espécie, raça, idade, condição da imunidade e saúde do animal infectado.
- Dependentes do Vírus**
 - Sorotipo, dose
- Dependentes do Ambiente**
 - Temperatura, Estação do Ano, Umidade, Votor



PATOGENIA



Replicação viral primária ocorre no tecido linfoide e células endoteliais dos capilares e pequenos vasos, causando **hipoxia, edema, e hemorragia**.

HOSPEEIROS



Língua azul

OVINOS

- Lesões graves: em alguns países morbidade e mortalidade (20-50%) - **No Brasil surtos esporádicos.**



Ovelhas lanadas da raça Merino
Fonte: <http://www.tecnologiaetreinamento.com.br.jpg>



Ovelhas de corte da Dorper & White Dorper
http://www.accoes.com.br/guiaracas_21,dorper.html



(COSTA et al., 2006).

INFECÇÃO EM OVINOS

- LA pode se apresentar como uma doença severa
 - Mortalidade de 20-50%
- Sinais clínicos
 - Febre 41-42°C
 - Dispneia
 - Hiperemia em vários órgãos
 - Corrimento nasal mucopurulento ou sanguinolento
 - Edema da língua, focinho, lábios e mucosa oral
 - Cianose da mucosa oral (originou o nome) e nasal
 - Diarreia (hemorrágica)
 - Hemorragia na porção coronária dos cascos é comum e está associada à degeneração muscular, levando à claudicação
- Vesículas, erosão, ulceração, crostas na boca e lábios.

Língua azul ovinos



Edema de face e hiperemia em ovinos (Lacaune) - foco de língua azul ocorrido em 2013 no Rio de Janeiro. Fotos cedidas por Balaro.

Raça que se adaptou na Serra RJ (temperatura amena) – produção queijo
Conforto animal: temperatura ambiente em torno de 23 a 25°C

Língua azul



Lesão em ovinos (Lacaune) - petéquias, escoriações, erosões, úlceras e necrose do tecido bucal - foco de língua azul ocorrido em 2013 no Rio de Janeiro. Fotos cedidas por Balaro.

Língua azul



Lesão em ovinos –
hiperemia e escoriações
no lábio superior - 8 dias
após infecção por BTV-4

Escoriações no lábio
superior - 9 dias após
infecção por BTV-4

SINAIS CLÍNICOS



Fotos gentilmente cedidas pelo
Dr. M. Spedicato (IZSAM)

Conjuntivite



Fonte: IAH, 2006



Inflamação da mucosa
nasal e edema

Fonte: IAH, 2006

Fonte: IAH, 2006

Inflamação do rodete coronário



Cianose da língua



Fonte: IAH, 2006



Depressão e Apatia

Fonte: IAH, 2006



Hiperemia e Inflamação da mucosa gengival

Fonte: IAH, 2006

Língua azul - BOVINOS E CAPRINOS

Lesões: em alguns países morbidade e mortalidade (5% bovinos e menos de 1% em caprinos) – No Brasil raras descrições de manifestação clínica em decorrência de infecção pelo vírus da língua azul nestas espécies.



Bovinos de corte da raça Nelore

Fonte:<http://www.infoescola.com/zootecnia/abate-de-bovinos/>



Caprinos da raça Boer

Fonte:<http://informed.com.br/informe-economico/>

Língua azul - BOVINOS E CAPRINOS

- Bovinos atuam como reservatórios da LA (GORCHS & LAGER, 2001);
- Recente epizootia pelo VLA-8 na Europa, foi observado **muitas lesões de pele e mucosas**. Também ocorreram problemas reprodutivos: abortamento, nascimento de bezerros com defeitos congênitos (**artrogripose - rigidez articular**) (WILSON et al., 2009);



Fonte: Klewer (2007)



Fonte: Instituto for Animal Health

BOVINOS – SINAIS CLÍNICOS

Europa



Áreas com hemorragia

Fonte:<http://www.thebeefsite.com/diseaseinfo/245/bluetongue-btv>



Extensa área hemorrágica e exsudato seroso



Área focal, com extensa hemorragia e ulcerção associada na superfície ventral da língua.

Língua azul em bovinos

No Brasil são raros os registros de manifestação clínica nesta espécie. Infecção geralmente é assintomática e detectada pela presença do vírus no sangue ou de anticorpos no soro dos animais.

Europa:
descritos casos de infecção no início da prenhez, provocando morte embrionária e reabsorção, aborto ou produzindo efeitos teratogênicos nascimento de bezerros com hidrocefalia, microcefalia, cegueira e deformações da mandíbula (BTV-8).

Também evidenciado em bovinos edema de face, úlceras na mucosa oral e nasal, ulcerações em tetos, diarreia crônica.



Desprendimento do epitélio do foleto em bezerro



BOVINOS – SINAIS CLÍNICOS

EUROPA



Lesões ulcerativas nos tetos.



Edema

INFECÇÃO EM BOVINOS

- < de 1% apresentam manifestação clínica
- Viremia prolongada e por uma doença branda ou inaparente
 - Viremia pode chegar a 100 dias
 - Sinais clínicos
 - Edema de face
 - Úlceras na mucosa oral e nasal
 - Ulcerações em tetas
 - Abortamento e má formação congênita - hidrocefalia, microcefalia, cegueira e deformações da mandíbula
 - Diarréia crônica
 - Crescimento excessivo dos cascos

Língua azul

CERVÍDEOS

- Lesões graves: – morbidade (90-100%) e mortalidade (80-90%)



Cervideo dama (Mazama americana)
- Veado Mateiro –América do Sul - Pantanal



Cervo-do-pantanal (Blastocerus dichotomus) – América do Sul.

Fonte:http://amandoanimais.blogspot.com.br/2010_12_01

Língua azul

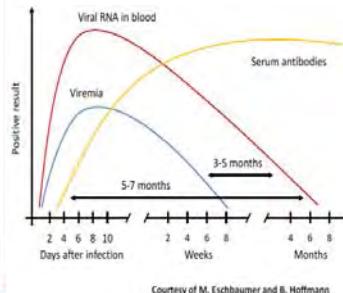
2015 e 2016 - no Estado do Paraná, como parte de um projeto de pesquisa sobre doenças dos cervídeos na reserva ecológica da empresa Itaipu Binacional, veados (*Mazama nana*) apresentaram sinais clínicos sugestivos de BTV seguido de morte.



As amostras foram testadas por isolamento viral, RT-qPCR e sequenciamento, sendo identificados, pela primeira vez, os sorotipos BTV-3, -14, -18, -19 e -22 no território brasileiro (OIE, 2016).



Infecção de ruminantes - Viremia prolongada (não persistente), associação do vírus com eritrócito



Courtesy of M. Eschbaumer and B. Hoffmann



Estudos demonstraram que o RNA viral pode ser detectado em sangue de ruminantes infectados por até 220 dias (BONNEAU, 2002; BHATTACHARYA et al., 2010).

RESPOSTA IMUNE

A resposta imune em ruminantes é detectada por volta de 7 a 14 dias após infecção e geralmente persiste por toda a vida do animal.



DIAGNÓSTICO

Sinais Clínicos

Estudo Epidemiológico

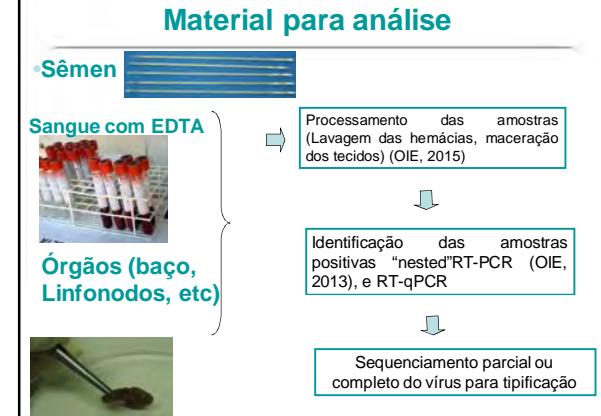
Laboratorial

- Baseado principalmente em métodos moleculares e de isolamento viral (OIE, 2015)
 - Isolamento do vírus em ovos embrionados
 - Isolamento do vírus em culturas celulares
 - ELISA
 - Imunodifusão em agar gel (IDGA)
 - PCR
 - Virusneutralização



DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

- Diagnóstico diferencial de fundamental importância
- As lesões ulcerativas de mucosa e pele e nas regiões interdigitais em ovinos e bovinos podem ser confundidas
 - Febre aftosa
 - Febre catarral maligna
 - Dermatite pustular contagiosa
 - Varíola bovina e pseudovariola
 - Ectima contagioso
 - Doença da fronteira
 - Podridão das patas
 - Actinobacilose
 - Mamilité herpética bovina



Vírus está presente principalmente na membrana eritrocitária



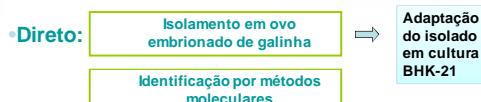
Material para detecção direta do BTV



Detecção direta do agente

- O BTV pode ser detectado nos eritrócitos, nos quais ele não se replica, mas persiste em invaginações da membrana celular, permanecendo protegido do sistema imune (WHEFTER et al., 1989).
- A detecção de RNA viral até 220 dias após a infecção é muito semelhante à vida dos eritrócitos nos ruminantes
- Vírus encontra-se associado às células sanguíneas (principalmente monócitos, linfócitos e eritrócitos)

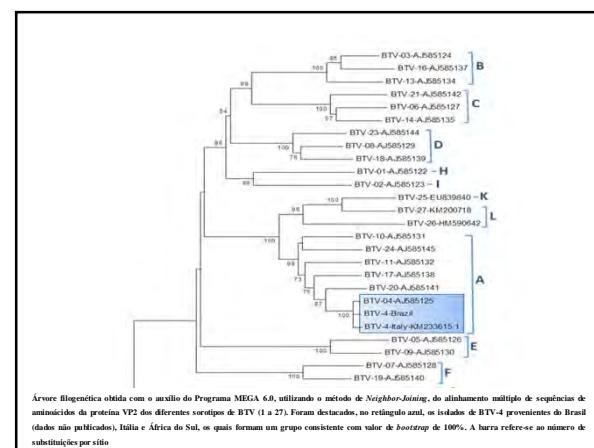
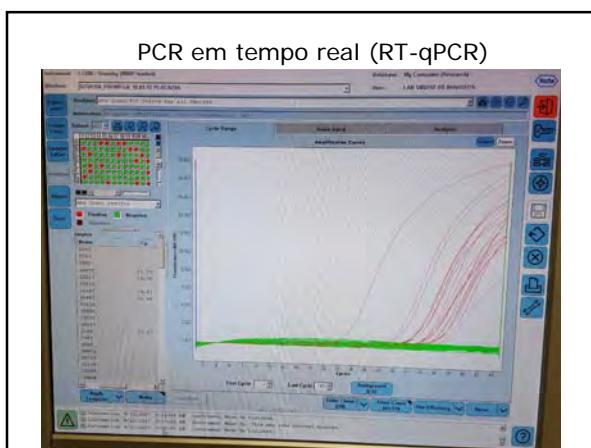
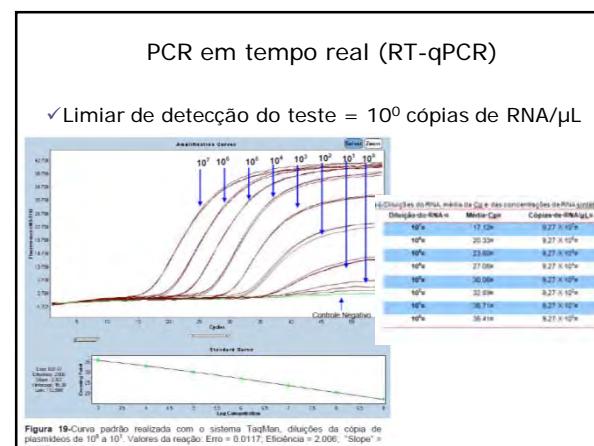
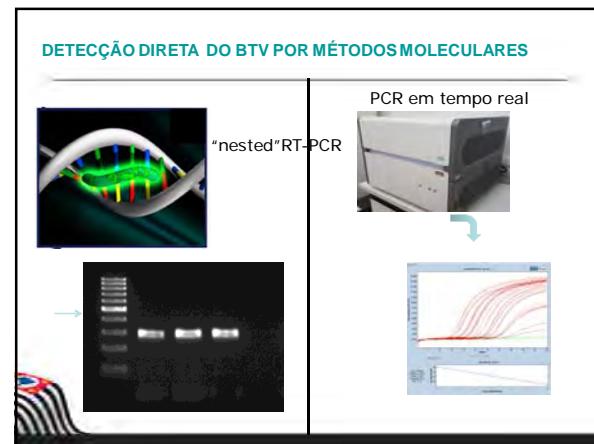
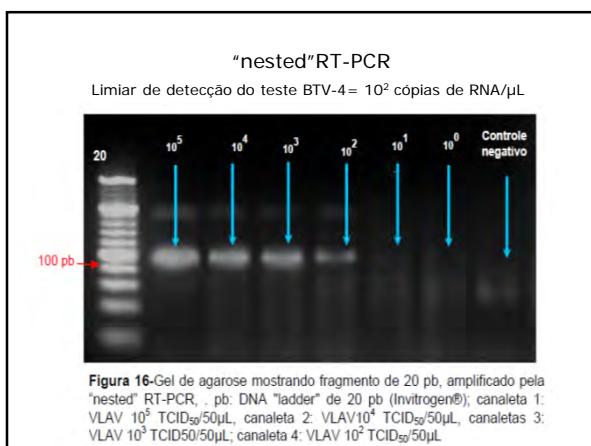
Métodos para detecção direta do BTV e de anticorpos

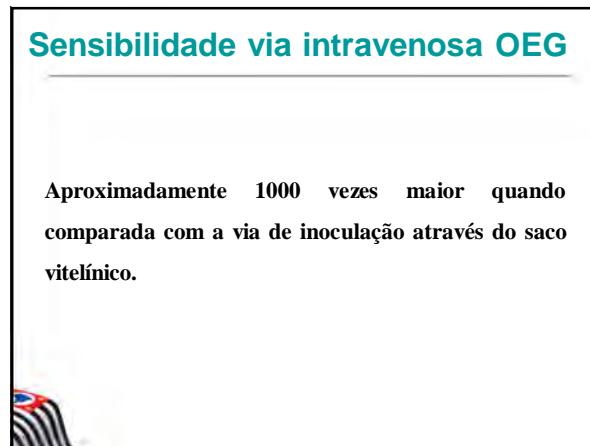
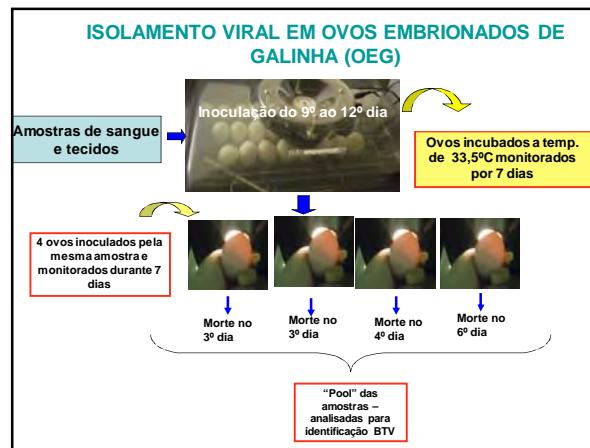
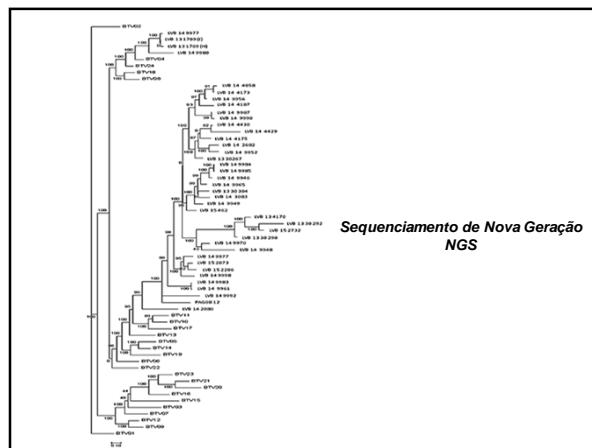


• **Detecção anticorpos:**



(OIE, 2015)





LESÕES EMBRIÃO

O vírus pode ser isolado em vários tipos de linhagens celulares:

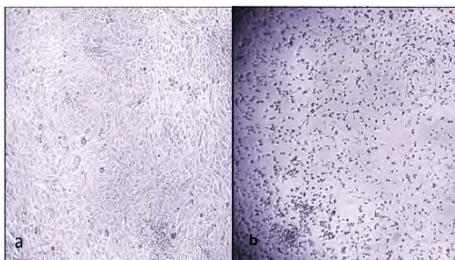
Mamíferos [BHK-21 (*Baby hamster kidney cell*), VERO (*African green monkey kidney*), CPAE (*Calf Pulmonary Artery Endothelial Cell*)]

Insetos (KC – derivada de *Culicoides sonorensis*, e C6/B6 de *Aedes albopictus*) (WECHSLER et al., 1989; MECHAM, 2006).



Passagem em células VERO

Após isolamento em OEG o BTV foi adaptado em VERO



Controle celular com monocamada de célula VERO (a) e CPE em monocamada celular inoculada com BTV-2 (b) observadas em microscópio de luz invertido (aumento 10x). Observa-se arredondamento celular, formação de sincícios, agrupamento de células, morte e lise celular.

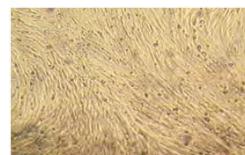
IMUNODIAGNÓSTICO - DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-BTV



IDGA - identifica anticorpos contra os 27 sorotipos de BTV + doença hemorrágica epizoótica - EHD (Reação cruzada)
Deteta anticorpos anti-VP7 (antígeno comum ao grupo)

Células BHK

As amostras isoladas em OEG são adaptadas em BHK para formação do banco viral LVB/IB



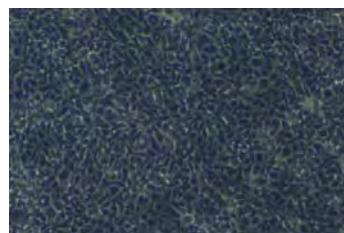
Monocamada célula BHK-21,
controle negativo, 20x



Efeito citopático do VLA, amostra positiva, com 3 dias após a infeção com 10³ TCID₅₀/mL de célula BHK-21, 20x. Foi observado arredondamento celular, formação de sincícios, agrupamento de células, morte e lise celular. Meemabagal et al., (2006).

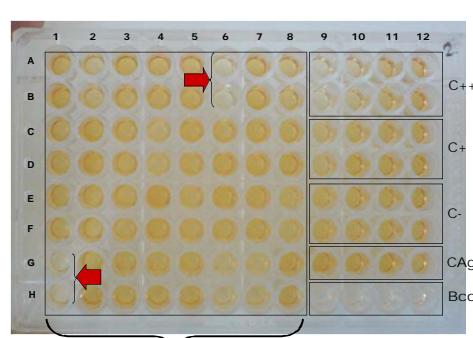
As amostras positivas, que tiveram ECP entre o 3º e 5º dia após a inoculação, foram submetidas a titulação viral, sendo constatados títulos virais que variaram de 10^{-2,8} a 10^{-3,5} TCID₅₀/mL.

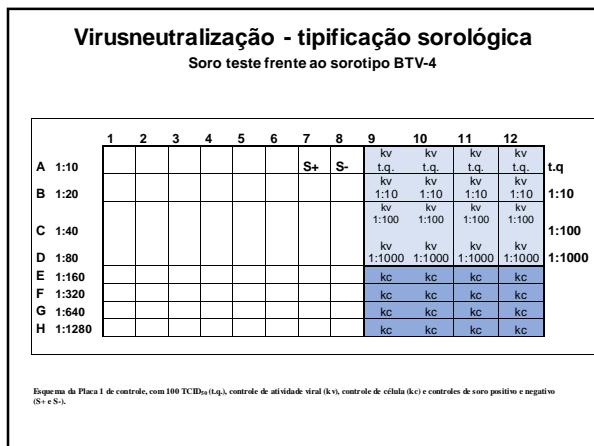
Células de insetos (KC)



Monocamada de células KC cells (100X).

• Placa de ELISA-CFS (pesquisa de anticorpos anti-BTV)

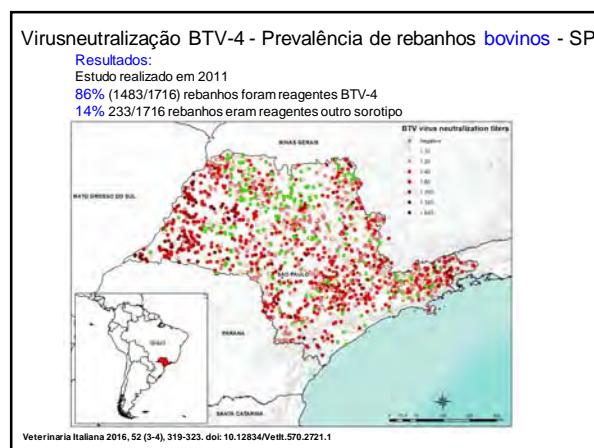
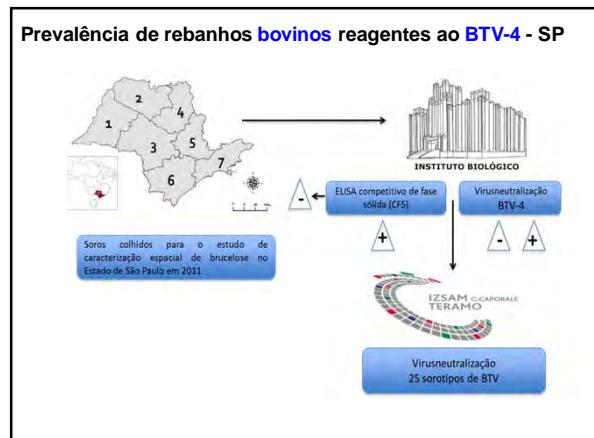
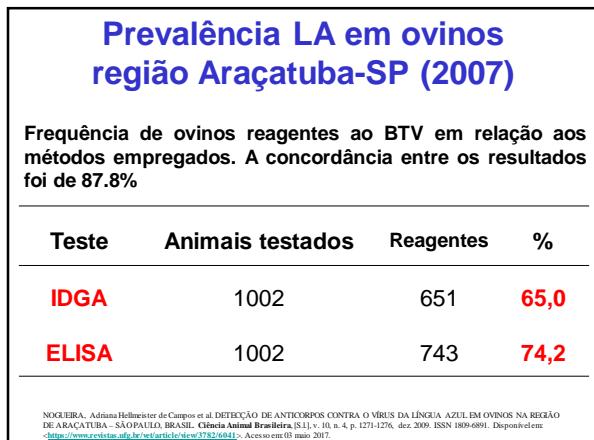




Métodos de diagnóstico recomendados Manual OIE (capítulo 2.1.3, Maio 2016)

Method	Purpose					
	Population freedom from infection	Individual animal freedom from infection prior to movement	Contribute to eradication policies	Confirmation of clinical cases	Prevalence of infection – surveillance	Infection status in individual cattle or populations post-vaccination
Agent identification ¹						
Real-time RT-PCR	-	***	-	***	++	-
RT-PCR	-	***	-	***	++	-
Classical virus isolation	-	***	-	***	-	-
Detection of immune response ²						
C-ELISA (serogroup specific)	++	***	++	-	++	++
VN (serotype specific)	--	***	--	-	--	--
AGID	-	-	*	-	*	*
CFT	-	-	*	-	*	*

Key: +++ = recommended method; ++ = suitable method; + = may be used in some situations, but cost, reliability, or other factors may limit its use; -- = not appropriate for the situation; * = not recommended due to lack of validation. Although not all of the tests listed in category *** or ++ have undergone formal validation, their routine nature and the fact that they have been used widely without dubious results, makes them acceptable.
RT-PCR = reverse-transcription polymerase chain reaction; C-ELISA = competitive enzyme-linked immunosorbent assay; VN = virus neutralization; AGID = agar gel immunodiffusion; CFT = complement fixation test.



Prevalência e caracterização espacial de sorotipos do vírus da língua azul em bovinos, São Paulo, Brasil, 2011

Metodologia – Virusneutralização – Leitura

Prevalência e caracterização espacial de sorotipos do vírus da língua azul em bovinos, São Paulo, Brasil, 2011

Resultados parciais BTV-1

Escala 1:5.000

- 0,3% (5/1.598) de amostras com títulos de Ac igual ou superior a 1:80
- Estrela do Norte (circuito 1), Porangaba (circuito 6), Santo André, Pirapora do Bom Jesus e Mairiporã (circuito 7)
- 2,1% (33/1.598) com títulos de Ac 1:40

Círculo 1, 2, 3, 4, 5, 6

Prevalência e caracterização espacial de sorotipos do vírus da língua azul em bovinos, São Paulo, Brasil, 2011

Resultados parciais BTV-2

Escala 1:5.000

- 0,5% (8/1.598) de amostras com títulos de Ac igual ou superior a 1:80
- Presidente Epitácio (circuito 1), Macedônia (circuito 2), Quatá, São Pedro do Turvo (circuito 3) Jardinópolis, São Carlos, Araraquara (circuito 4), Buri (circuito 6);
- 1,9% (30/1.598) com título de Ac 1:40
- 7 circuitos

Prevalência e caracterização espacial de sorotipos do vírus da língua azul em bovinos, São Paulo, Brasil, 2011

Resultados parciais BTV-3

Escala 1:5.000

- No município de Santa Cruz do Rio Pardo (circuito 3), identificou-se o BTV-3 em uma única amostra 0,06% (1/1.598) com título de Ac (1:1.280);
- 1,2% (19/1.598) com título Ac 1:40;
- 7 circuitos

Prevalência e caracterização espacial de sorotipos do vírus da língua azul em bovinos, São Paulo, Brasil, 2011

Resultados parciais BTV-4

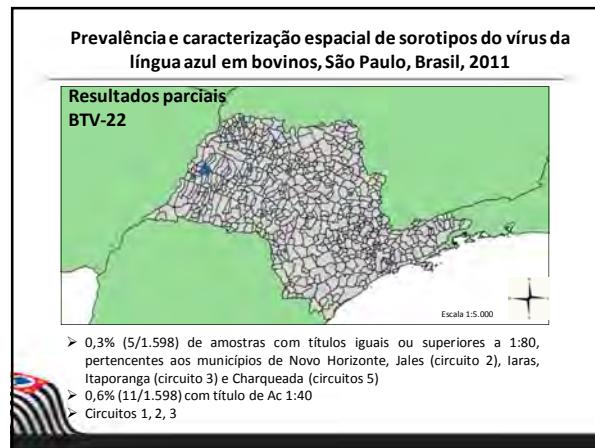
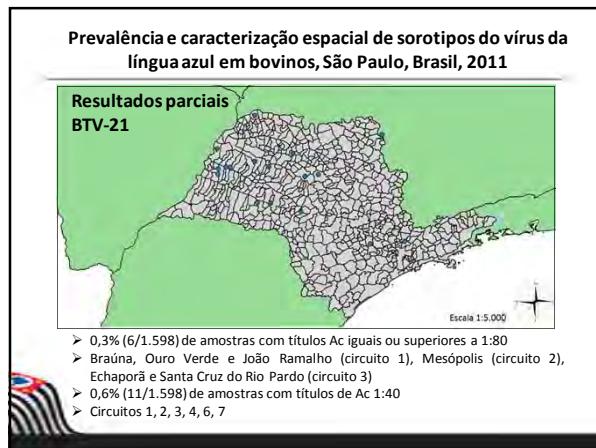
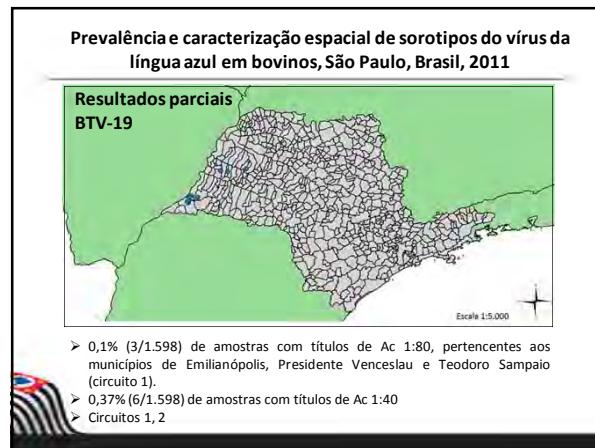
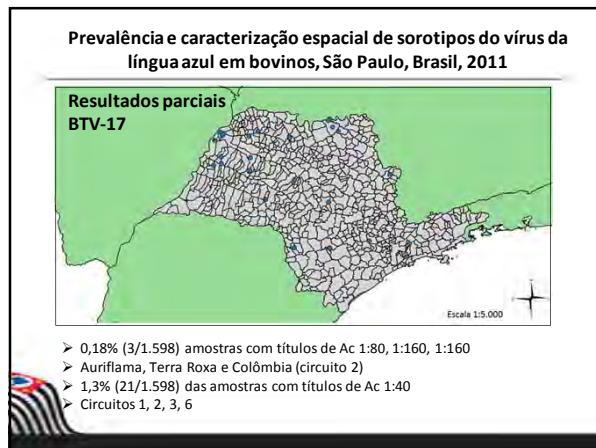
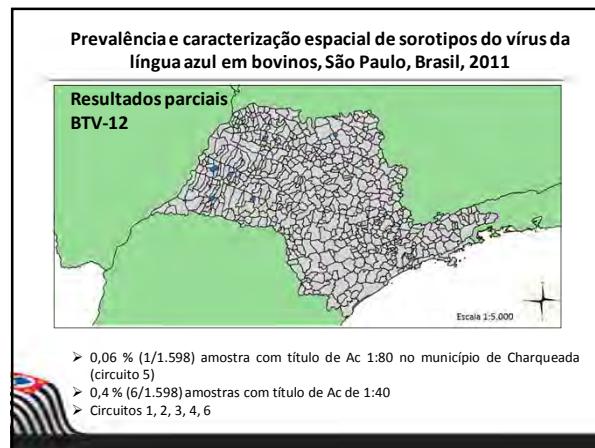
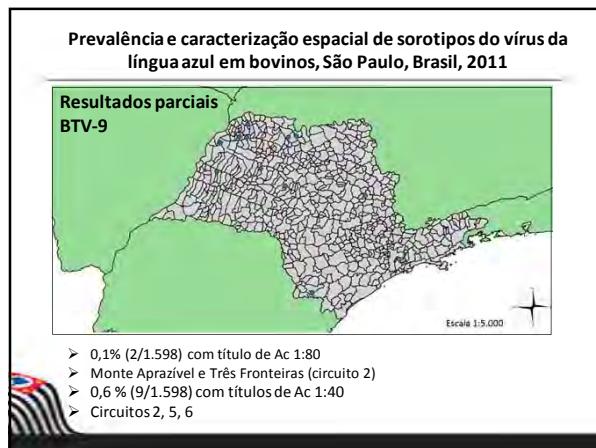
Escala 1:5.000

- 0,6% (10/1.598) das amostras com títulos de Ac iguais ou superiores a 1:80
- 2,2% (34/1.598) com título 1:40
- 6% (96/1.598) com títulos 1:20
- 7 circuitos

Prevalência e caracterização espacial de sorotipos do vírus da língua azul em bovinos, São Paulo, Brasil, 2011

**Resultados parciais
Discrepância de resultados- BTV-4**

- VN realizada no IB/SP - 86% (1.483/1.716)
- VN realizada no IZSAM/IT – 8,7% (140/1.598)
- Nogueira et al., (2014) confirmam a alta prevalência de Ac contra BTV-4 em bovinos do Estado de São Paulo.





Prevalência da língua azul em bovinos - mesorregião norte central do Paraná

- Analizados 633 soros, todos reagentes pelo método ELISA competitivo (ELISA CFS).
- Virunneutralização frente ao **BTV-4**, 64,61% (409/633) reagentes (NEGRI FILHO, et al 2015-Endesa 2015).
- Clima úmido e quente favorável à proliferação dos vetores.

Pesquisa de Anticorpos – Touros

Resultados das análises dos soros dos touros, colhidos em diferentes períodos, em diferentes Centros de coleta e processamento de sêmen, para detecção de anticorpos contra o vírus da Lingua Azul utilizando a técnica de IDGA, 2006-08, São Paulo, SP

Mês/Ano Colheita	% de Reagentes para LA (Reagentes/Total touros examinados)
Março 2006	67,2 (131/195)
Setembro 2006	85,6 (89/104)
Março 2007	99,0 (95/96)
Setembro 2007	83,2 (84/101)
Março 2008	88,7 (86/97)
Setembro de 2008	85,4 (100/117)

Pesquisa de Antígeno - Sêmen de touros

Distribuição do número de amostras de sêmen bovino testadas para língua azul pela técnica de *nested* RT-PCR, de acordo com as Centrais de Inseminação Artificial, no período de 2007-08, São Paulo, SP

Central	Nº Touros analisados	Nº Partidas Analisadas	Resultado <i>nested</i> RT-PCR	
			Positivo	Negativo
A	139	365	1	364
B	1	1	0	1
C	160	1467	0	1467
D	51	250	0	250
E	20	48	0	48
F	29	94	0	94
G	4	44	0	44
Total	404	2269	1	2268

FUTURO

- Possíveis efeitos de recombição viral e rearranjos (genótipo e condições ambientais) influenciando o fenótipo de BTV - aumentar virulência
- Identificar vetores competentes
- Mecanismo de sobrevivência da larva do inseto contaminado (hibernação e outras condições)
- Estabelecer o mecanismo preciso envolvendo transmissão transplacentar e disseminação pelo sêmen
- Riscos de transmissão pelo embrião produzido *in vivo* e *in vitro*
- Identificar sorotipos de BTV existentes no Brasil e seus efeitos nas várias espécies (estimular pesquisas).
- Confirmar a possível transmissão horizontal dos sorotipos de BTV-25, 26 e 27

DESAFIOS PARA O FUTURO

EPIDEMIOLOGIA

Avaliar o impacto das alterações climáticas na distribuição global do BTV

Influência provocada pelo homem - efeito das estirpes de vacina viva atenuada

ESTRATÉGIAS DE CONTROLE

Prevenir propagação:

- Desenvolver vacinas seguras e com eficácia mais duradoura
- Controle do vetor é viável? Conhecer a biologia dos culicoides (estimular pesquisas).
- Avaliar impacto da infecção pelo BTV na produção animal no Brasil



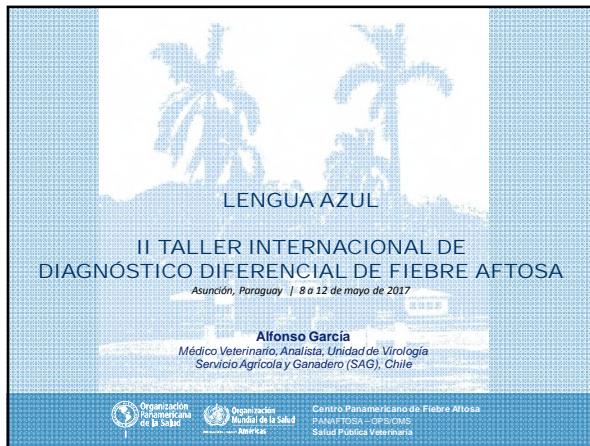
OBRIGADA



www.paho.org/panaftosa



Twitter/panaftosa_inf Facebook/kmcPANAFTOSA



Lengua Azul

The screenshot shows the IDvet website interface. At the top, there is a navigation bar with links: Home, About us, Products, Support, News, and Contact. Below the navigation bar, there is a banner featuring a horse's head and the text "IDvet Diagnostics". On the left side, there is a sidebar with sections for "IDVET GENETICS" (RUMINANTS, Antigenic plasmid propagation, Immunoblotting, RT-PCR, qPCR) and "BLUETONGUE" (RT-PCR, RT-ELISA). The main content area features a large image of a horse's head and the text "ID Screen® Bluetongue Competition". Below this, there is a detailed description of the kit: "Competitive ELISA kit for the detection of anti-BTV antibodies in serum or plasma from multiple species. • Proven specificity and sensitivity in BTV seropositive caprine and bovine sera. • Detection of antibodies against all BTV serotypes by heat titration after (dotted) immunoblotting. • One-step competitive ELISA format for economical antibody screening for the early diagnosis of BT disease. • Easy-to-use. Only one assay step. Results available in minutes." At the bottom of the page, there is a "SPECIFICATIONS" section with tabs for "Method" (Competitive ELISA) and "Species" (Bovine, Caprine, Ovine, Equine, Camelid, Swine, deer).

ELISA Competencia INGENASA



Ingezim BTV COMPAC 2.0
R.I. BTV/X3



Ingezim BTV Compac 2.0 es un ensayo inmunocromatográfico basado en la técnica de ELISA de��uel que detecta un antígeno monoclonal específico frente a la proteína X3 del virus de la Enfermedad Azul (BTV) y anticuerpos recombinantes.

BASE TÉCNICA DEL KIT

1. Absorción de la muestra en presencia de BTV (anticuerpo IFT inmunonegativo). Los resultados de aviso se obtienen en los resultados de la prueba IFT.
2. Absorción de la muestra frente a la X3, testeando con anticuerpos recombinantes.
3. Absorción de anticuerpos monoclonales específicos de BTV recompatibles con la muestra, que se une a la proteína X3. Los anticuerpos monoclonales se unen a la proteína X3 y se detectan mediante una reacción de coloración.

APLICACIÓN

- 1. Para la detección de anticuerpos específicos de la proteína X3 (IIFT).
- 2. Una vez de haberse hecho la prueba IIFT, se procederá a la prueba de sensibilidad respecto a la tasa de IIFT.
- 3. Al finalizar la prueba, se procederá a la lectura de los resultados de la respuesta, indicándose el resultado final.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

El resultado es positivo si el O.D. es mayor o igual a la media de los resultados de los controles positivos. El resultado es negativo si el O.D. es menor que la media de los resultados de los controles negativos dividido por 100. Si el resultado es menor que el resultado de los controles negativos dividido por 100, se considera que el resultado es negativo. Los resultados que están entre el resultado de los controles positivos y negativos son considerados indeterminados.

VALIDACIÓN

MUESTRAS DE DUELO

1. Experiencia en muestras de sangre de caballo sano, 92 muestras y 1275 muestras de sangre de caballo con BTV.
2. Sensibilidad (positividad/negatividad): Se establecieron 24 muestras de sangre de caballo con BTV. El resultado resultó positivo en el análisis de los resultados de los 24 análisis.
3. Specificidad (negatividad/negatividad): Se establecieron 100 muestras de sangre de caballo sano. El resultado resultó negativo en el análisis de los resultados de los 100 análisis.

MUESTRA DE LECHE

Con objeto de determinar la sensibilidad y especificidad del ensayo, se analizaron las siguientes muestras de leche obtenidas:

- 481 muestras de lecheras vacas negativas.

VMRD

Test Kits

Bluetongue Virus Antibody Test Kit, cELISA

Test Kits

Bluetongue Virus Antibody Test Kit, cELISA v2

DESCRIPTION:
VMRD's new cELISA v2 test kit brings you the same rapid and convenient features of the original version (40 minutes total incubation time) along with new features including distilled water wash.

Lengua Azul

Diagnósticos Molecular:
Kits Comercial VetMax PCR Tiempo Real
Convencional , protocolo OIE

VetMAX™ Bluetongue Virus (BTV) Reagents

Código de catálogo: 441527

ANEXO 041: LENGUA AZUL KIT VETMAX

Fecha:												
Análisis:	RT-PCR TIEMPO REAL LENGUA AZUL KIT VETMAX											
Operador:												
Nº Muestras:	4											
KIT VETMAX												
Reactivos:	µl por 1 reacción	µl por X n° reacción										
2X Multiplex RT-PCR Buffer	12,5	87,5										
Multiplex RT-PCR Enzyme Mix	2,5	17,5										
DNA Polymerase mixtura	1	7										
Ribonuclease free Water	0,5	3,5										
Xeno	0,5											
Subtotal	17	119										
Templado ARN	8											
Total	25											
IA												
		Reportes	Unidades									
		(BTV)RNA	FAM	NONE								
		(BTV) RNA CONTROL	VIC	NONE								
Gabinete Mix	3	2	5	Salinete PCR	1	2	Real Time	1	2	3	4	
Termociclar	1	2	3	4	5	6	7	8	Obs: Solo en ABI Fast 7500 y Biored			
Protocolo de cocción (Cycling Conditions)												
		Id. de ciclos	Paso	Tiempo en segundos	Temperatura °C							
		1	Denaturation	10 min	95°C							
		1	Desaturación inicial	10 min	95°C							
		40	Desaturación	95s	95°C							
			Amplificación	30s	60°C							
Referencia: v2 VETMAX Bluetongue (BTV) - ThermoFisher												

ANEXO 53: PLANILLA LENGUA AZUL

Fecha:	PCR CONVENCIONAL DETECCIÓN LENGUA AZUL											
Análisis:												
Operador:												
Nº Muestras:	3											
Reactivos:												
	µl por reacción	µl por X n° reacción	Conc. final	Check								
5x Buffer	5	35	xx									
10mM DTT	0,5	3,2	6,32 mM									
25mM MgCl ₂	1,3	9,0	1,33 mM									
100 U de RNase Inhibitor	0,3	1,8	180 U									
DNApol de Primus L.A.C	0,5	2,0	0,8 mM (2pmol)									
DNApol de Primus L.A.D	0,5	2,0	0,5 mM (2pmol)									
Enzima Mix Gligen	1	4,0										
Aqua free	7,7	56,0										
Sub total	17	128,0										
PCR	8	52,0										
Total	25	180,0										
IA												
		Real Time	LAB A: GTC-CTC-TAG-TG-GCA-ACC-ACC LAB B: AGG-CCA-GAC-TGT-TTG-CG-AT									
Gabinete Mix	1	2	3	Gabinete PCR	1	2	Real Time	1	2	3	4	
Termociclar	1	2	3	4	5	6	7	8	Obs:			
Protocolo de cocción (Cycling Conditions)												
		Id. de ciclos	Paso	Tiempo en segundos	Temperatura °C							
		1 ciclo	denat.	10 segundos	95°C							
		40	Desaturación	15 segundos	95°C							
			Amplificación	15	53							
			extensión	15	72							
		1	extensión	30	72							
			conservación	0	4							
Referencia: MANUAL OIE CAP. 2.01.03, 2014												

ANEXO 53: PLANILLA LENGUA AZUL-NESTED

Fecha:	PCR DETECCIÓN LENGUA AZUL NESTED											
Análisis:												
Operador:												
Nº Muestras:	3											
Reactivos:												
	µl por reacción	µl por X n° reacción	Conc. final	Check								
10x Buffer	2,5	10,0	xx									
10mM DTT	0,5	2,0	0,5 mM									
25mM MgCl ₂	0,30	1,20	0,12 mM									
DNApol de Primus L.A.C	0,5	2,0	0,8 mM (2pmol)									
DNApol de Primus L.A.D	0,5	2,0	0,5 mM (2pmol)									
Taq Platinum	0,125	0,5										
Aqua free	17,125	68,5										
Sub total	27	100,0										
PCR	3	12	100,0									
Total	27	100,0										
IA												
		Real Time	LA C: GCA-GCA-TTT TGA-GA-G-C-G-A LA D: CCC-GAT-CAT ACA-TTG-CTT-C-C-T									
Gabinete Mix	1	2	3	Gabinete PCR	1	2	Real Time	1	2	3	4	
Termociclar	1	2	3	4	5	6	7	8	Obs:			
Protocolo de cocción (Cycling Conditions)												
		Id. de ciclos	Paso	Tiempo en segundos	Temperatura °C							
		1 ciclo	Denaturation	15	95							
		40	Desaturación	15	52							
			Amplificación	15	72							
			extensión	15	72							
		1	extensión	30	72							
			conservación	0	4							
Referencia: MANUAL OIE CAP. 2.01.03, 2014												

Lengua Azul

- Batten, C. A., Edwards, L., Oura, C. A. L. 2013. Evaluation of the humoral immune responses in adult cattle and sheep, 4 and 2.5 years post-vaccination with a bluetongue serotype 8 inactivated vaccine. *Vaccine*, 31(37), 3783-3785.
- Batten C.A., Bachanek-Bankowska K., Bin-Tarif A., Kposona L., Swain AJ., Corteyn M., Darpei K., Mellor PS., Elliott HG., Oura CAL. 2008. Bluetongue virus: European Community inter-laboratory comparison tests to evaluate ELISA and RT-PCR detection methods. *Veterinary Microbiology* 129: 80-88.
- Niedbalski W. 2011. Evaluation of commercial ELISA kits for the detection of antibodies against bluetongue virus. Polish Journal of Veterinary Sciences Vol. 14, No. 4 (2011), 615-619.
- Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). 2014. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres [en línea] <http://www.oie.int/es/normas/internacionales/manual-terrestre/>.
- Stringi S., y Shringi B. N.. 2005. Comparative efficacy of standard agid, ccie and competitive elisa for detecting bluetongue virus antibodies in indigenous breeds of sheep and goats in Rajasthan, India. *J. Vet. Sci.* 6(1), 77-79.
- Velić L., Velić R., Bajrović T., Dukić B. y Čamo D. 2004. Bluetongue in Bosnia: comparisons of competitive enzyme-linked immunosorbent assay and standard agar gel immunodiffusion tests. *Vet. Ital.*, 40 (4), 562-563.

 Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
CENPAFTA - Centro de Referencia Interamericano

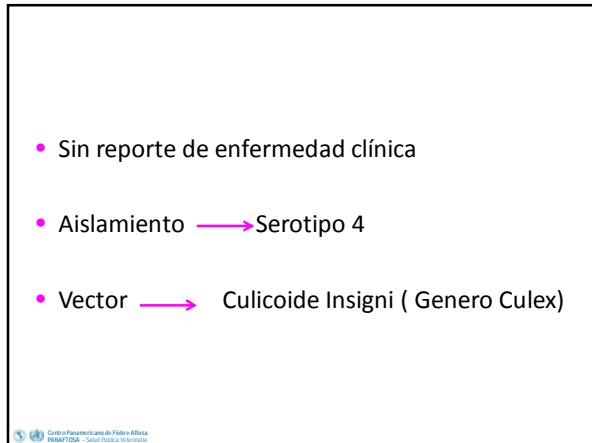
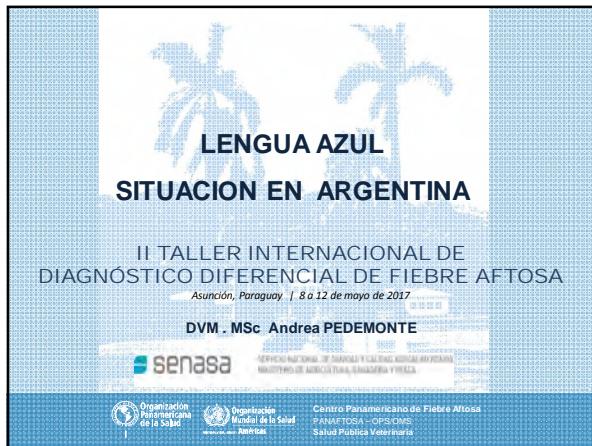
- Wilson W., Gaudreault N., Jasperson D.C., Johnson D., Ostlund E., Chan CK., Ruder M.G., Stallknecht D.E. 2015. Molecular evolution of American field strains of Bluetongue and Epizootic hemorrhagic disease viruses. *Veterinaria Italiana*. 51 (4): 269-273.
<https://www.thermobiofer.com/order/catalog/product/74415202>
- Vandenbussche, F., et al., Evaluation of antibody-ELISA and real-time RT-PCR for the diagnosis and profiling of bluetongue virus serotype 8 during the epidemic in Belgium in 2006. *Vet. Microbiol.* (2007), doi:10.1016/j.vetmic.2007.10.029
- https://tools.thermobiofer.com/content/ids/manuals/cme_079627.pdf
- <https://www.id-vet.com/product/id-screen-bluetongue-competition/>
- <https://www.vmr3.com/reagents/detail/bluetongue-virus-btv-fa-substrate-slide/>

 Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
CENPAFTA - Centro de Referencia Interamericano

www.paho.org/panaftosa



[Twitter/panaftosa_inf](#) [Facebook/kmcPANAFTOSA](#)



VIGILANCIA

Pasiva



Sospechas de casos clínicos
Cuarentena Exportación

2010 al 2016 ➔ Sin notificaciones

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOSA - Sistema de Información

ACTUALIDAD

Estudios Serológicos

Comportamiento y
dinámica LA
Revalidar Status

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOSA - Sistema de Información

www.paho.org/panaftosa

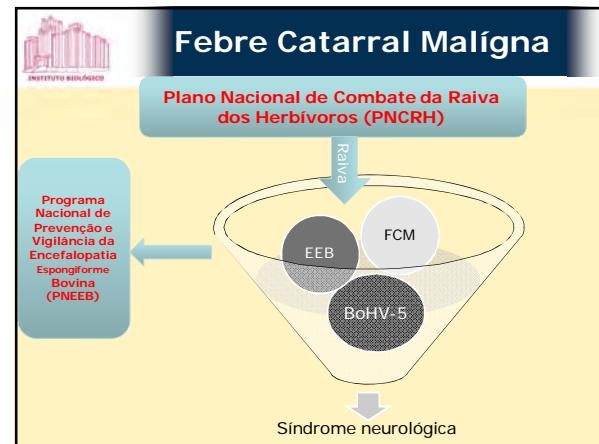
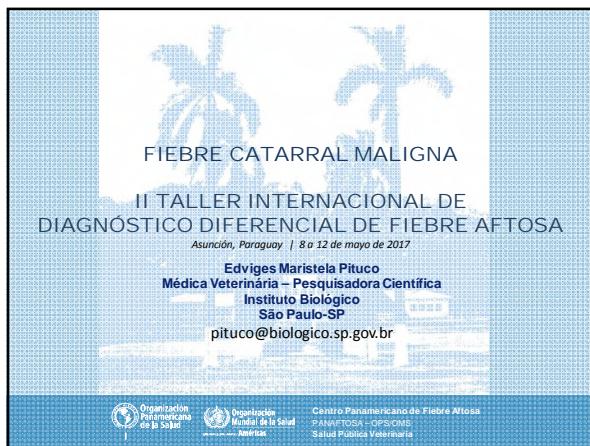


MUCHAS GRACIAS!

SENASA
LABORATORIO DE REFERENCIA OIE PARA FIEBRE AFTOSA
DVM. MSc Andrea Pedemonte
apedemon@senasa.gob.ar

Twitter/[panaftosa_inf](#) Facebook/[kmcPANAFTOSA](#)

FIEBRE CATARRAL MALIGNA



Febre Catarral Maligna (FCM)

- ✓ Distribuição geográfica mundial
- ✓ Diagnosticada no Brasil desde 1924
- ✓ Afeta muitas espécies (*Bovideos, Cervideos, suideos, girafa, bisão e antílope*)
- ✓ Doença viral aguda ou crônica com grande variabilidade de sinais clínicos devido aos diversos órgãos que podem ser afetados.
- ✓ Pode causar infecções latentes e fatais;
- ✓ Agente infeta células linfoides

Agente etiológico FCM

- ✓ Família Herpesviridae
- ✓ Subfamília *Gammaherpesvirinae*
- ✓ Gênero *Macavirus*
- ✓ Latência
- ✓ Core é um filamento linear de DNA dupla fita
- ✓ Capsídeo icosaédrico
- ✓ Envelope viral é uma bicamada lipídica com 11 glicoproteínas inseridas **gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gL e gM** dentre outras
- ✓ Tamanho do genoma 125 a 295 kpb
- ✓ Pode codificar 70 a 200 proteínas

Febre Catarral Maligna

ANISTÉTICO BIOLÓGICO

Febre Catarral Maligna

Grupo de agentes etiológicos antigenicamente e geneticamente relacionados, causando infecções assintomáticas nos reservatórios. Ao infectar outras espécies, entretanto, os vírus do gênero Macavirus podem causar doença fatal.

Gênero Macavirus (09 espécies virais)

- *Ovine gammaherpesvirus 2* (OvHV-2)
- *Alcelaphine gammaherpesvirus 1* (AlHV-1)
- *Alcelaphine gammaherpesvirus 2* (AlHV-2)
- *Caprine gammaherpesvirus 2* (CpHV-2)
- *Hippotragine gammaherpesvirus 1* (HiHV-1)
- *Bovine gammaherpesvirus 6* (BoHV-6)
- *Suid gammaherpesvirus 3, 4 e 5* (SuHV-3, 4 e 5), known as porcine lymphotropic viruses)

Taxonomy - ICTV

ANISTÉTICO BIOLÓGICO

Order: Herpesvirales

- + Family: Alcelaphinidae
- Family: Herpesviridae
- Subfamily: Gammapapovirinae
- Genus: Macavirus
- (9 Species) history

Species:

- ★ *Alcelaphine gammaherpesvirus 1* history
- Alcelaphine gammaherpesvirus 2* history
- Bovine gammaherpesvirus 6* history
- Caprine gammaherpesvirus 2* history
- Hippotragine gammaherpesvirus 1* history
- Ovine gammaherpesvirus 2* history
- Suid gammaherpesvirus 3* history
- Suid gammaherpesvirus 4* history
- Suid gammaherpesvirus 5* history

<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>

Ovine gammaherpesvirus 2 (OvHV-2)

ANISTÉTICO BIOLÓGICO

• Febre catarral maligna ovino-associada (FCM-OA) – reservatório é o ovino

Em bovinos causa principalmente opacidade bilateral de córnea e neuropatia

Em rebanhos endêmicos a transmissão entre ovinos pode ocorrer via leite e secreções naso-oculares no primeiro ano de vida

Bovine gammaherpesvirus 6 (BoHV-6)

ANISTÉTICO BIOLÓGICO

Infecta células linfoides de ruminantes domésticos e selvagens. O BoHV-6, anteriormente conhecido como vírus linofrótico bovino, foi isolado pela primeira vez nos EUA a partir de leucócitos de bovinos com linfossarcoma e subsequentemente relatado na Europa e Canadá.

Jia et al. Journal of General Virology (2014)
DOI 10.1099/vir.0.06951-0

Bovine herpesvirus 6 in buffaloes Pará-Brasil

ANISTÉTICO BIOLÓGICO

a

b

Bovine herpesvirus 6 in buffaloes (*Bubalus balicus*) from the Amazon region, Brazil
Trop Anim Health Prod, 2014 DOI 10.1007/s11250-014-0732-z

Caprine gammaherpesvirus 2 (CpHV-2)

ANISTÉTICO BIOLÓGICO

→ endêmico em cabras (causa febre catarral maligna em algumas espécies de cervídeos (deer) que convivem com cabras

**Alcelaphine gammaherpesvirus 1
(AIHV-1)**

INSTITUTO BIOLÓGICO

- FCM gnu-associada (FCM-GA) → Isolado em 1960 → gnus (*Connochaetes taurinus* e *Connochaetes gnu*, subfamília Alcelaphine).

Fonte: <http://en.wikipedia.org/wiki/Wildebeest>

**Alcelaphine gammaherpesvirus 2
(AIHV-2)**

INSTITUTO BIOLÓGICO

- isolado de bubalú – antílope africano (*Alcelaphus buselaphus*) e topi (*Damaliscus lunatus*)

Fonte: http://www.biodiversityexplorer.org/mammals/ruminants/alcelaphus_buseleaphus.htm e http://www.biodiversityexplorer.org/mammals/ruminants/damaliscus_lunatus.htm

**Hippotragine gammaherpesvirus 1
(HiHV-1)**

INSTITUTO BIOLÓGICO

- isolado de palanca-vermelha (*Hippotragus equinus*).

Fonte: http://www.biodiversityexplorer.org/mammals/ruminants/hippotragus_equinus.htm

**Suid gammaherpesvirus
3, 4 e 5**

INSTITUTO BIOLÓGICO

Porcine lymphotropic herpesviruses (PLHV-1, PLHV-2 e PLHV-3).

Isolamento viral

INSTITUTO BIOLÓGICO

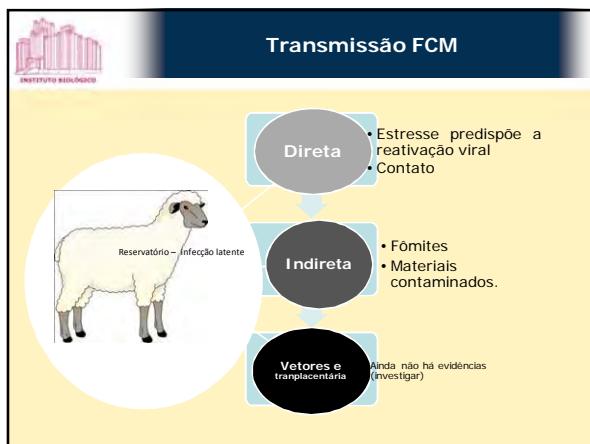
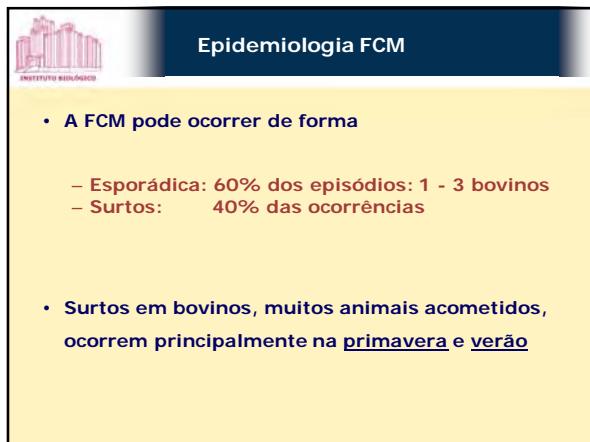
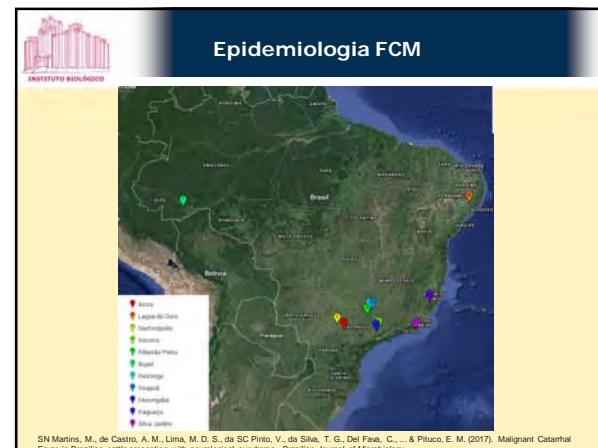
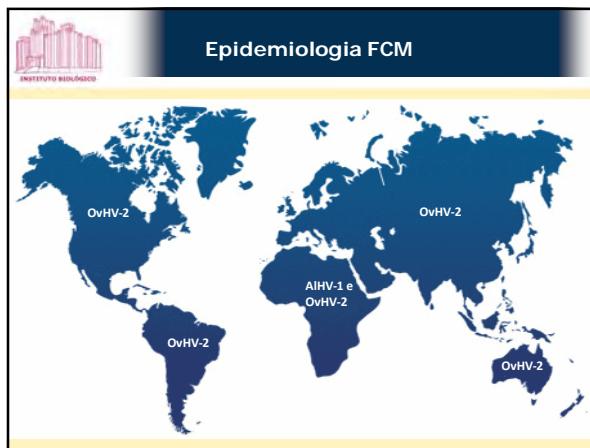
A maioria dos vírus do gênero Macavirus não se multiplicam em cultura de tecidos ou ocorre lentamente. Há isolamento documentado apenas para o *Alcelaphine gammaherpesvirus 1* (AIHV-1).

DEFINIÇÃO FCM

INSTITUTO BIOLÓGICO

AIHV-1 e OvHV-2 causam infecções subclínicas no reservatório gnus e ovinos, respectivamente, mas em bovinos e outros ruminantes causam febre catarral maligna, uma doença sistêmica frequentemente fatal (doença linfoproliferativa) caracterizada por acúmulo de linfócitos em uma variedade de órgãos.

- Febre alta, depressão, corrimiento nasal e ocular, opacidade da córnea, ceratoconjuntivite, **erosões e ulcerações nas mucosas de diversos órgãos e na pele.**



TRANSMISSÃO FCM

- Há relatos de casos de infecção transplacentária pelo vírus da FCM em bovinos e bisões (possibilidade de manutenção do vírus em animais que nascem infectados).
- Cervídeos também desenvolvem a doença e podem tornar-se reservatórios (latentamente infectados e em situações adversas manifestam a doença e liberam vírus infectando outros suscetíveis).

MANIFESTAÇÃO CLÍNICA FCM

Período de incubação → 3 a 10 semanas – podendo se estender até 200 dias.

Casos fatais curso da doença → três a sete dias e raramente prolonga-se por mais de 14 dias.

MANIFESTAÇÃO CLÍNICA FCM

Dependendo do padrão clínico - intensidade e duração dos sinais clínicos a FCM tem sido classificada nas formas:

- ✓ hiperaguda,
- ✓ “cabeça-e-olho”,
- ✓ digestiva,
- ✓ respiratória
- ✓ neurológica (SNC),
- ✓ dérmica,
- ✓ leve ou branda.

Manifestação clínica FCM

Forma Hiperaguda:

- ✓ febre alta,
- ✓ dispneia,
- ✓ gastrenterite hemorrágica aguda,
- ✓ rápida perda de peso,
- ✓ podendo ocorrer morte súbita,
- ✓ curso clínico da doença 3 a 7 dias.



Manifestação clínica

Forma “cabeça-e-olho” → Síndrome clássica da FCM

- ✓ Aparecimento súbito de sinais:
- ✓ Cavidade oral (**erosões e ulcerações**)
- ✓ Oculares (opacidade de córnea)
- ✓ Febre

Manifestação clínica FCM

CAVIDADE ORAL (nesta fase pode confundir com doença vesicular)

- ✓ Hiperemia,
- ✓ Áreas de necrose no focinho e erosão do epitélio bucal
- ✓ Úlceras e erosões focais ou difusas no palato duro, gengiva, almofada dental, comissuras labiais, lábios e superfície dorsal da língua,
- ✓ Nessa fase há intensa salivação.



Manifestação clínica FCM



Manifestação clínica FCM



Úlcera na narina

Foto: arquivo LVB/IB

01. 01. 2002

Manifestação clínica FCM



OCULARES

- ✓ Secreção ocular serosa ou seromucosa,
- ✓ A opacidade da córnea é característica,



Fonte: GALIZA et al. 2007.




FCM corrimiento ocular em bovino - foco Guapiara -SP
Foto: arquivo LVB/IB

<http://www.cfsph.iastate.edu/DiseasesInfo/ImageDB/images/MCF.htm>

Manifestação clínica FCM



RESPIRATÓRIA

- ✓ Descarga nasal
- ✓ Dispneia e estertor
- ✓ Congestão e necrose cavidade nasal
- ✓ O plano nasolabial de bovino pode apresentar ulcerações recobertas por crostas resultantes do ressecamento de exsudato e tecido necrosado



Manifestação clínica respiratória FCM






Febre catarral maligna em bovinos no Rio Grande do Sul. Sinais clínicos. Corrimento nasal muco-purulento em ambas as narinas.

Rech, et al. - Prog. Vet. Bios., vol. 25 no. 2 Rio de Janeiro Apr./June 2008

Fonte: https://lookforadagnosis.com/mesh_info.php?term=Febre%20Catarra%20Maligna&lang=3

Manifestação clínica FCM



Aparelho Digestivo

- ✓ Diarreia fétida, profusa, muitas vezes hemorrágica,
- ✓ Perda de peso,
- ✓ Comum em cervídeos



Fonte: <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseasesInfo/ImageDB/images/MCF.htm>

LESÕES APARELHO DIGESTIVO





Fonte: <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseasesInfo/ImageDB/images/MCF.htm>

Manifestação clínica FCM

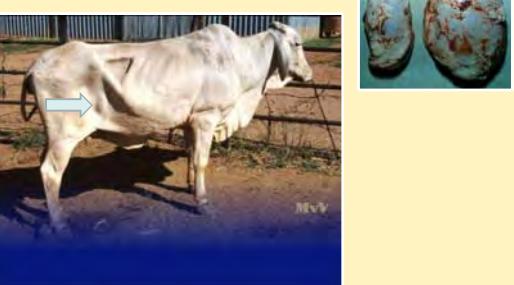
Neurológica (SNC)

- ✓ Fraqueza,
- ✓ Letargia,
- ✓ Incoordenação,
- ✓ Ataxia,
- ✓ Agressividade,
- ✓ Convulsões .



<https://www.fao.org>

FCM (hipertrofia de órgãos linfoides)



<http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/ImageDB/ImagesMCF.htm>

Manifestação clínica FCM

Leve ou branda

- ✓ Febre transitória,
- ✓ Erosões discretas nas mucosas oral e nasal,
- ✓ Secreção nasal,
- ✓ Diarreia com muco,

Podendo seguir-se por:

- ✓ Completa recuperação,
- ✓ **FCM crônica** (pode recrudescer).

Manifestação clínica FCM



Fotos - Bovino acometido por febre catarral maligna. A) Decíbulo esternal e descarga nasal mucopurulenta. B) Opacidade de córnea. C) Múltiplas lesões erosivas e ulcerativas associadas à dermatite crostosa no focinho. D) Mucosa oral hiperêmica e com erosões lineares multifocais (Peixoto, TC. et al 2015)

Manifestação clínica FCM



Bovino acometido por febre catarral maligna. Múltiplas úlceras na língua (Headley et al 2012)

Búfalo acometido por febre catarral maligna. Mostrando descarga nasal mucopurulente (Costa et al 2009)

MATERIAL PARA DETECÇÃO DIRETA DO VÍRUS CAUSADOR DA FCM

Coleta de amostras para diagnóstico *ante mortem*

Há liberação de vírus pelas secreções nasal e ocular de bovinos acometidos.



Suabes de Rayon - Não deve ser utilizado suabe de algodão, pois o mesmo interfere nas metodologias moleculares.

MATERIAL PARA DETECÇÃO DIRETA DO VÍRUS CAUSADOR DA FCM

Coleta de amostras para diagnóstico *ante mortem*

As amostras coletadas de diferentes sítios das vias respiratórias ou qualquer outra localização anatômica devem ser acondicionadas individualmente, em recipientes estéreis e imersas em meio de transporte viral ou solução salina tamponada (PBS pH 7.2) suplementadas com antibióticos.

MATERIAL PARA DETECÇÃO DIRETA DO VÍRUS CAUSADOR DA FCM

Coleta de amostras para diagnóstico *post mortem* (Conservar refrigerado)

Linfonodos
Fragmento da córnea

Fragmento de órgão

Colocar amostras em recipientes separados e devidamente identificados.

MATERIAL PARA EXAME ANATOMO-PATOLÓGICO

Coleta de amostras para diagnóstico *post mortem* (EM FORMOL)

Principalmente a rede admirável carotídea e porção do intestino com placas de Peyer.

Vasculite necrosante e fibrinóide generalizada são as lesões histológicas características da FCM

MATERIAL – exames FCM

- Ante-mortem:**
 - Sangue total (anticoagulante EDTA); - **ELEIÇÃO**
 - Swab nasal.
 - Swab de lesões
- Post-mortem:**
 - Para análise histológica, (conservar em formaldeído tamponado);
 - Rede admirável carotídea (*Rete mirabile carotídea*) - **ELEIÇÃO**
 - Porção do intestino com placas de Peyer - **ELEIÇÃO**
 - Outros fragmentos de tecidos, SNC, rim, fígado, pulmão, olho, baço, coração, linfonodos, medula, adrenal, glândula salivar, qualquer área da pele ou trato alimentar com lesões macroscópicas.
 - Para análise molecular (conservar refrigerado ou congelado):
 - Rede admirável carotídea ou qualquer parte do SNC, rim, fígado, pulmão, olho, coração, linfonodos, medula, adrenal, glândula salivar, qualquer área da pele ou trato alimentar com lesões macroscópicas.

Exame Laboratorial FCM

Forma ovino associada

Pesquisa direta

lesões - histopatologia
isolamento viral (OvHV-2) nunca isolado

PCR qualitativo e qPCR

Pesquisa indireta

Imunofluorescência
Imunoperoxidase

ELISA

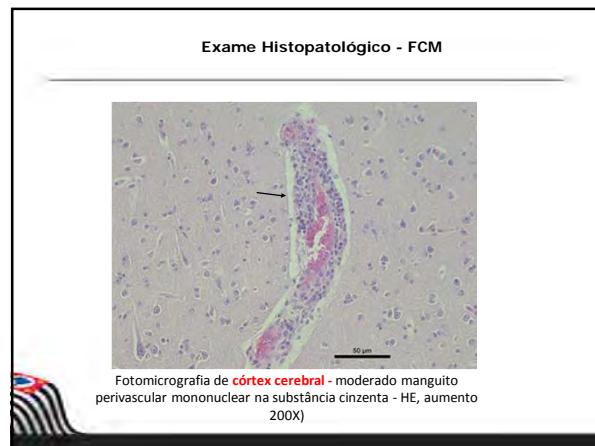
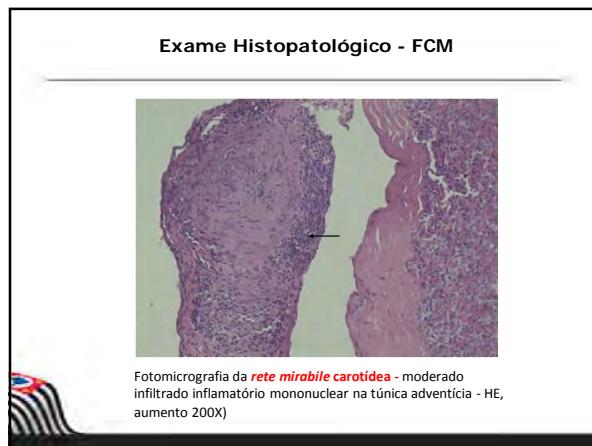
Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2014

B. DIAGNOSTIC TECHNIQUES

Table 1. Test methods available for the diagnosis of malignant catarrhal fever and their purpose

Method	Purpose			
	Natural host species	Clinically affected animals	All animals	
	Population freedom from infection	Individual animal freedom from infection	Confirmation of clinical cases	Prevalence of infection – surveillance
PCR	+	+	+++	++
C-ELISA	+++	+++	++	+++
Virus isolation	-(AIHV-1)	+(AIHV-1)	+(AIHV-1)	+(AIHV-1)
Virus neutralisation	+(AIHV-1)	+(AIHV-1)	-	-
IFAT	+	+	+	-
Immunoperoxidase test	+	+	+	-

Key: +++ = recommended method; ++ = suitable method; + = may be used in some situations, but cost, reliability, or other factors limit its application; - = not appropriate for this purpose.
Although not all of the tests listed as category ++ or + have undergone formal standardisation and validation, their routine nature and the fact that they have been used without dubitable results makes them acceptable.
PCR = polymerase chain reaction; C-ELISA = competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay; IFAT = indirect fluorescent antibody test. Note that virus isolation and virus neutralisation have only been documented for AIHV-1.



DETECÇÃO DIRETA DO AGENTE

INSTITUTO BIOMÉDICO

- PCR - método de escolha**
 - sangue total, secreções e suspensão de órgãos
 - tecidos emblocados em parafina

PCR OvHV-2

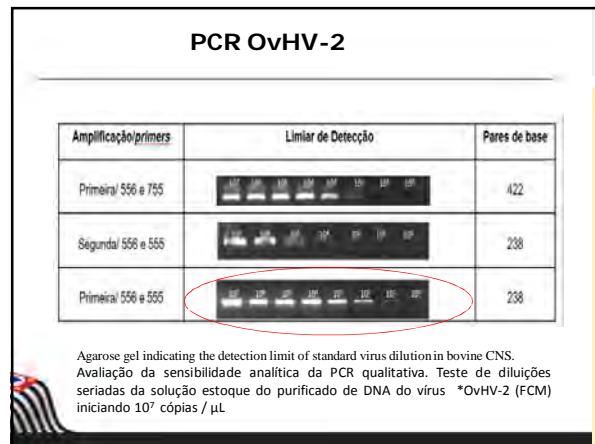
Sequência dos primers, sonda de hidrólise e localização da região de hibridação e tamanho do amplificado. Localização dos nucleotídeos baseado na sequência do GenBank (n. acesso [DQ198083.1](#)). Região do genoma ORF75.

Nome	Método	Seqüência	Região de hibridação	Fragmento
FCM 556	PCR qualitativa	5'-GTCTGGGTATATGAATCCAGATGGCTCTC-3'	121536 pb- 121507 pb	422 pb
FCM 755		5'-AAGATAAGCACCAAGTTATGCATCTGATAAA-3'	121115 pb- 121144 pb	
FCM 555		5'-TTCTGGGTAGTGGCGAGCGAAGGCTTC-3'	121301 pb- 121328 pb	
of-OvHV- 2	qPCR	5'-TGGTAGGAGCAGGCTACCGT-3'	121348 pb- 121367 pb	131 pb
oR-OvHV-2		5'-ATCATGCTGCCCCCTGCAG-3'	121478 pb- 121459 pb	
FAM/TAMRA oP-OvHV-2		5'-TCCACGCCGTCGGACTGTAAAGA-3'	121390pb- 121412pb	

PCR qualitativa (convencional) - primers

✓ Região ORF75 do genoma do OvHV-2 → codifica uma proteína do tegumento viral altamente conservada .

Nome	Autor	Seqüência	Localização do Genoma
FCM 556	BAXTER et al., 1993	5'-GTCTGGGTATATGAATCCAGATGGCTCTC-3'	121536pb- 121507pb
FCM 755		5'-AAGATAAGCACCAAGTTATGCATCTGATAAA-3'	121115 pb- 121144 pb
FCM 555		5'-TTCTGGGTAGTGGCGAGCGAAGGCTTC-3'	121301pb- 121328pb



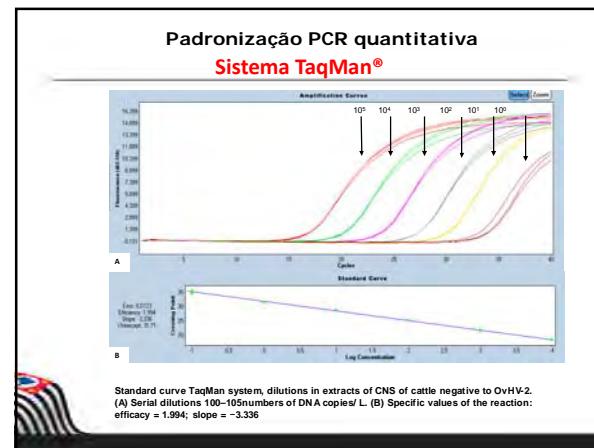
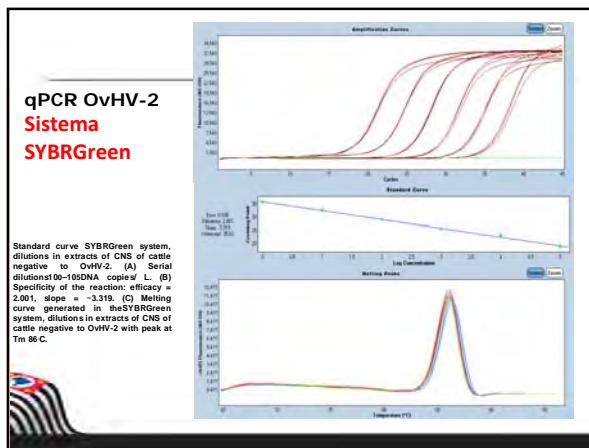
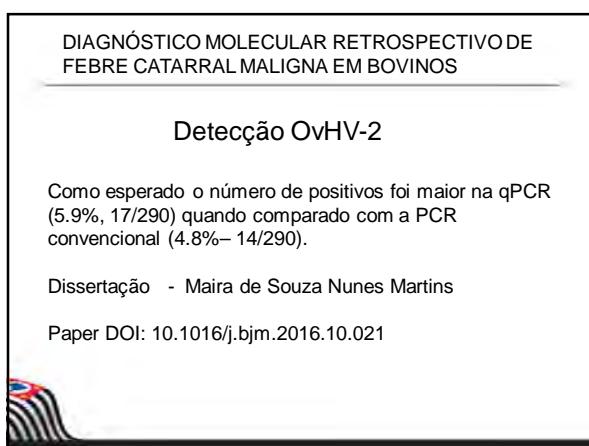


Table 2 - Sample identification for year collecting, age animals (in months), number of dead or sick animals/herd, quantification cycle (Cq), DNA copies per tissue gram by qPCR, results of qualitative PCR, results of histology and country/state where the sample came from.

Sample identification	Year	Age (months)	Number of dead or sick animals/herd	Quantification cycle (Cq)	DNA copies per tissue gram	Qualitative PCR	Histology	County/state
798/07	2007	96	1/21	264	1.5×10^5	POS	POS	Assis/SP
6355/09	2009	36	2/350	268	1.2×10^5	POS	POS	NP/PE
6386/09	2009	48	3/350	246	4.6×10^5	POS	POS	NP/PE
6251/09	2009	3	NI*	265	1.5×10^5	POS	POS	Lagoa D'Ourô/PE
1398/09	2009	56	1/150	309	3.9×10^5	POS	NEG	Martimópolis/SP
364/12	2012	38	NI*	297	1.7×10^4	POS	POS	Socorro/SP
1157/01/12	2012	84	NI*	352	0.9×10^5	NEG	NEG	Cacapava/SP
2422/11/12	2012	18	1/300	304	0.9×10^4	POS	NEG	Ribeirão Preto/SP
2042/8/13	2013	36	NI*	241	6.6×10^5	POS	POS	Búzios/AC
5587/13	2013	48	NI*	352	0.9×10^5	NEG	NEG	Franca/SP
6414/13	2013	24	1/29	325	2.9×10^4	POS	NEG	Realeza/SP
7363/13	2013	48	5/350	333	1.4×10^4	POS	NEG	Itapipoca/SP
8011/13	2013	NI*	12/3106	33.6	1.1×10^4	POS	NEG	Queluz/SP
8012/13	2013	48	1/397	28.9	3.9×10^4	POS	POS	Morungaba/SP
8013/13	2013	5	1/254	33.5	1.0×10^4	POS	NEG	Itaguaçu/ES
2505/13	2013	48	1/350	33.7	0.8×10^4	POS	POS	Silva Jardim/RJ
2062/14	2014	36	3/344	35.0	1.0×10^3	NEG	NEG	Japeri/SP

* NI, not informed



 **Medidas preventivas**

- separar criações de ovinos e bovinos



"Well, what have I always said?" Sheep and cattle just don't mix.



www.paho.org/panaftosa



Twitter/panaftosa_inf Facebook/kmcPANAFTOSA

 **RELATO CASO 2007**

 **Defesa Agropecuária**

- Bovino suspeito de "Febre Catarral Maligna"
- Município de Cândido Mota/SP
- Inicialmente foi suspeito de doença vesicular, enviado Lanagro/MG para diferencial.



 **Relato de caso**

PROPRIEDADE

- Rebanho: 21 animais
- Vizinhos: não houve relato de problema semelhante
- Nenhuma outra espécie aparentemente acometida
- Havia criação suína em pociça contínua ao pasto dos bovinos (Suid gammaherpesvirus 3, 4 e 5, casos relatados na Escandinávia)
- Posteriormente no decorrer da investigação foi revelado que na origem do animal doente havia criação mista ovina com bovino



Relato de caso

- **Animal:** Bovino mestiço
- **Aptidão:** Leiteira
- **Idade:** 7 anos
- **Vacinado contra Febre Aftosa e Clostridiose**
- **Notificação pelo proprietário 26/08/07**
- **Atendimento pelo Serviço de Defesa DE SP: 27/08/07**



Evolução do quadro

27/08/07 31/08/07

- Corrimento ocular
- Inapetência
- Depressão
- Foi constatado lesões erosiva-ulcerativas na cavidade bucal, com desprendimento de epitélio, **SEM VESÍCULAS**
- Sem lesões nos cascos ou úbere
- Sialorreia
- lesões erosiva-ulcerativas

 INSTITUTO BIOLÓGICO	FCM
 03/09/07	 05/09/07
<ul style="list-style-type: none">- Depressão- Ataxia- Tremores musculares → tronco e cabeça- Sialorreia- Corrimento ocular bilateral- Opacidade da córnea- Desidratação- Inapetência- Temp. corpórea: 38° C	<ul style="list-style-type: none">● Decúbito lateral● Sialorreia intensa● Secreção muco-purulenta nas cavidades nasais● Desidratação e caquexia intensa● Animal submetido à eutanásia in extremis



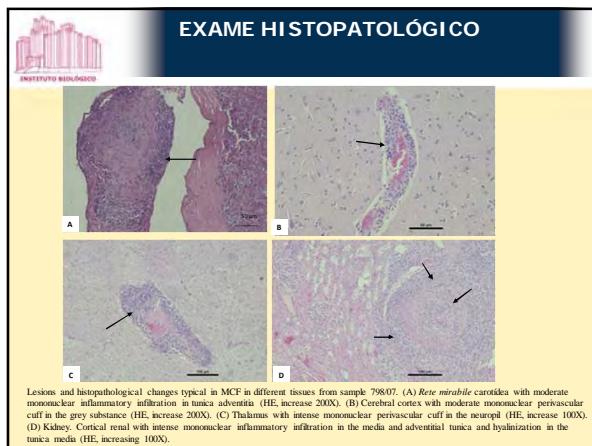
05/09/07

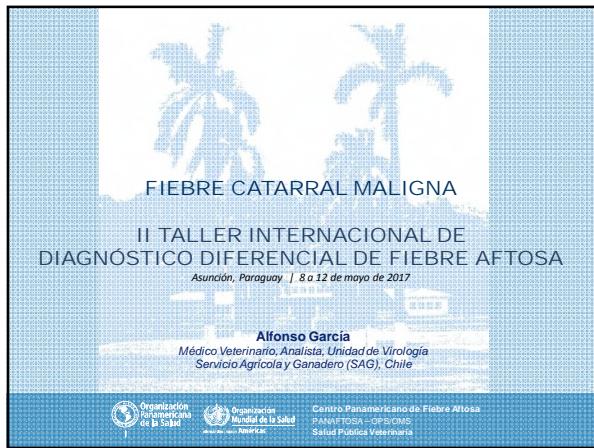
- Ao exame necroscópico:
- observaram-se erosões e úlceras na mucosa oral e gengiva, narinas e espaços interdigitais, hiperemia conjuntival, da mucosa das fossas nasais e da banda coronária dos cascos
- linfadenomegalia
- Lesões hemorrágicas (Abomaso, vesícula biliar e bexiga)
- Linfonodos com pus (rúmen e retículo)
- Cérvix e vagina com petéquias



MATERIAL PARA ANÁLISE

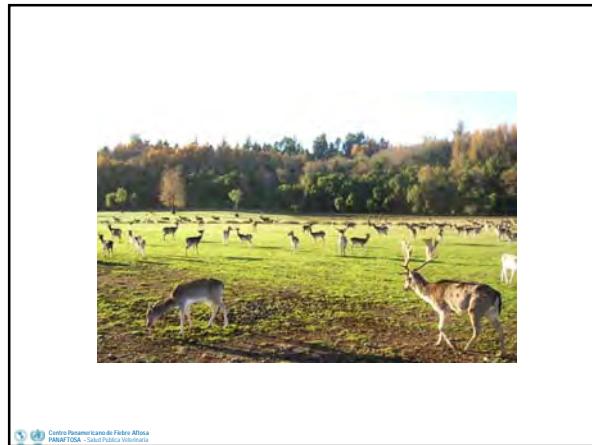
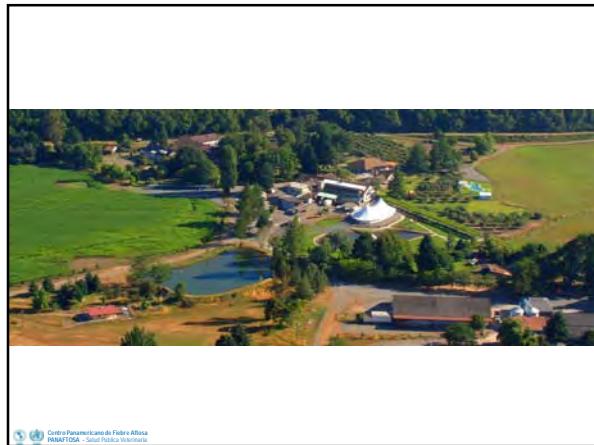
- Enviado ao Instituto Biológico
 - Fixado em Formol 10%:
 - Tronco encefálico, parte do cerebelo, parte do córtex cerebral e rede admirável carotídea
 - Congelado:
 - Vesícula biliar, parte do córtex cerebral, cerebelo, rim, abomaso, bexiga e soro sanguíneo.





FCM

- Chile No realiza un plan de Vigilancia Activa de FCM.
- La vigilancia se enfoca a una Vigilancia Pasiva basada en las denuncias de Enfermedades Diferenciales de Fiebre Aftosa.
- Requisito de Exportación , Seroneutralización
- Chile por lo tanto tiene implementado un Diagnóstico basado en Aspectos Moleculares.



PMC <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27272874/>

Journal of Clinical Microbiology
PMC Article | Author Info | Citations | Permissions | ISSN: 0091-4129

Development of a Multiplex Real-Time PCR for Detection and Differentiation of Malignant Catarrhal Fever Viruses in Clinical Samples -
Couto W, Costa J,¹ Lira O,² Moraes R,¹ Gómez P,¹ Varela J,² and Moraes J.¹
Author Information | Instructions | Citation and License Information

This article has been cited by 1 other article(s) in PMC.

ABSTRACT
A real-time real-time PCR was developed using a single pair of primers and the reverse primer specific for the malignant catarrhal fever viruses and an internal positive control. The assay was able to simultaneously detect and differentiate between malignant catarrhal fever viruses and bovine-derived malignant catarrhal virus.

Formats:
Article | Download | ePub | PDF
Share:
Facebook | Twitter | Google+ | LinkedIn
Save items:
Add to Favorites

Similar articles in PubMed:
Development of a multiplex real-time PCR for detection and differentiation of major human herpesviruses
Single tube multiplex real-time RT-PCR for hepatitis C virus and hepatitis E virus
Polymerase chain reaction amplification and Luminex-based malignant catarrhal disease diagnosis and typing of human lymphocyte polyomavirus (JCV) infection

- la PCR multiplex en tiempo real descrita en este estudio representa un método rápido, confiable y diferencial para la identificación de cinco MCFV patógenos en muestras clínicas, lo cual es de fundamental importancia para el diagnóstico de MCF
- capaz de detectar y diferenciar simultáneamente los virus en muestras clínicas con alta sensibilidad (97,2%) y especificidad (100%).
- PCR múltiple en tiempo real que utilizó un par de cebadores en conjunción con sondas fluorescentes marcadas específicamente para OvHV-2, CpHV-2, MCFV-WTD, MCFV-Ibex y AlHV-1 para la identificación de estos patógenos MCFV en muestras clínicas usando una sola reacción.
- Muestras: Sangre con EDTA, Linfonódulos, Bazo. También puede ser: Riñón, Pulmón e Intestino..... Refrigeradas

Development of a Multiplex Real-Time PCR for Detection and Differentiation of Malignant Catarrhal Fever Viruses in Clinical Samples. 2009. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2705110/, and www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2705110/. 2009 Aug;47(8):2586-2589.

 Centro Panamericano de Fiebre Aflaca
CENPAFTOSA - Centro de Estudios Avanzados

ANEXO 5: PLANILLA FIEBRE CATARRAL												
Fecha	RT-PCR TIEMPO REAL FIEBRE CATARRAL											
Análisis												
Muestras												
Reacciones	# de Reacción	# de pet X n° reacción	Cone. Total	Check								
Fund. qPCR/RT-PCR Master Mix												
2000 qPCR/11	0,75	5,3	0,000									
2000 qPCR/11	0,75	5,3	0,000									
Bazo FCFV-2	0,4	3,0	0,000	Diferencia								
Bazo FCFV-1	0,4	3,0	0,000	Diferencia								
AlHV	5,2	36,4										
Sub-total	5,2	36,4										
Templado (10)		3										
Total		39										
sequencer, F. Puntos:	TACAGCTCCACTGTTATTCAC											
sequencer, F. Puntos:	TACAGCTCCACTGTTATTCAC											
Partidores y tornales	FAM-AATTGCCTTGACCTC-BHQ1											
NPC-10000	Cyt FCBGTTGTGACATCA-BHQ2											
Silencio Mix	1	2	3	Silencio PLR	1	2	Real Time	1	2	3	4	
Terminación	1	2	3	4	5	6		7	8			
Condiciones:												
PCR												
100 °C 10s												
Preparación												
PCR												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												
100 °C 10s												

Fiebre Catarral Maligna En USA-FADDL

II TALLER INTERNACIONAL DE
DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE FIEBRE AFTOSA
Asunción, Paraguay | 8 a 12 de mayo de 2017

Consuelo Carrillo
Senior Animal Health Advisor
DSS-FADDL-STATS-VS-NVSL
APHIS-USDA

Organización Panamericana de la Salud
Organización Mundial de la Salud
Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFIOSA - OPS/OMS
Salud Pública Veterinaria

Fiebre Catarral Maligna

- Experiencia en US
 - Detección clínica y derivación de los casos
- Diagnóstico
 - Fotos de casos clínicos
 - Tipo de muestras
 - Problemas/soluciones
 - Técnicas molecular, serológicas y patológicas



Fiebre Catarral Maligna

- Experiencia en US
 - Detección clínica y derivación de los casos
- Diagnóstico
 - Fotos de casos clínicos
 - Tipo de muestras
 - Problemas/soluciones
 - Técnicas molecular, serológicas y patológicas

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFIOSA - Salud Pública Veterinaria

USDA

Fiebre Catarral Maligna

- OHV-2 es endémica en US
- AHV-1 es esporádica en zoológicos
- MCF es NO REPORTABLE, excepto para casos de diagnóstico diferencial
- NVSL (Ames) hace el Diagnóstico y FADDL hace solo casos bovinos, para diferencial de vesiculares, y animales exóticos



Fiebre Catarral Maligna

- Hay registros de AHV-1 en zoológicos de US que datan de los años 1970s
- En Abril 17, 2008, el laboratorio de USDA-NVSL de Iowa, confirmó un caso de AHV-1 MCF
 - una vaca lechera
 - comprada recientemente
 - En el rancho había ñues
 - La vaca murió con signos clínicos de MCF

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFIOSA - Salud Pública Veterinaria

USDA

2008 MCF/AHV-1 en Texas



1. Investigación epidemiológica
2. Trazado de ventas
3. Se localizaron 130 vacas en:
 - Illinois,
 - Arkansas,
 - Alabama,
 - Georgia,
 - Louisiana,
 - Mississippi,
 - and Texas
4. El transito de animales entre Estados no se vio afectado
5. Se indemnizó por pérdidas Comerciales en precio de carne
6. Se puso en cuarentena el rancho

USDA/APHIS. Statement by the Chief Veterinary Medical Officer John Clifford regarding detection of Malignant Catarrhal Fever in commercial cattle. April 18, 2008. http://www.aphis.usda.gov/newsroom/content/2008/04/malignant_cat_fever.shtml



Fiebre Catarral Maligna

- Experiencia en US
 - Detección clínica y derivación de los casos
- Diagnóstico
 - Fotos de casos clínicos
 - Tipo de muestras
 - Problemas/soluciones
 - Técnicas molecular, serológicas y patológicas

 Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFOSA - Salud Pública Veterinaria

 Servicio de Inspección a la Alimentación
Agencia de Recursos Naturales y Recaudación de Impuestos
Servicio de Inspección a la Alimentación

Caso Diagnóstico de 2016

- Única vaca afectada entre 250.
- Ninguna de las 42 ovejas o 6 cabras con síntomas.
- Vaca Holstein (400 Kg) con erupción cutánea
- Mas de 14 días con síntomas
- Rápida pérdida de peso
- Descarga ocular purulenta
- Lesiones orales, vulva y ubres
- Salivación excesiva
- Responde al tratamiento con penicilina, pero los síntomas reaparecen y no responde a un segundo tratamiento con antibióticos



 Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFOSA - Salud Pública Veterinaria

 Servicio de Inspección a la Alimentación
Agencia de Recursos Naturales y Recaudación de Impuestos
Servicio de Inspección a la Alimentación



 Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFOSA - Salud Pública Veterinaria

 Servicio de Inspección a la Alimentación
Agencia de Recursos Naturales y Recaudación de Impuestos
Servicio de Inspección a la Alimentación



 Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFOSA - Salud Pública Veterinaria

 Servicio de Inspección a la Alimentación
Agencia de Recursos Naturales y Recaudación de Impuestos
Servicio de Inspección a la Alimentación

Diagnóstico Diferencial

- FMD
- VSV
- BPS
- BT and EHD
- MCF

 Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFOSA - Salud Pública Veterinaria

 Servicio de Inspección a la Alimentación
Agencia de Recursos Naturales y Recaudación de Impuestos
Servicio de Inspección a la Alimentación

Muestras (Prioridad 3)

- Suero
- Hisopados nasales, orales, de ojo, vagina y ubres
- Costras y epitelio de lesiones
- Fluido vesicular
- Sangre completa (Heparina y EDTA)

 Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFOSA - Salud Pública Veterinaria

 Servicio de Inspección a la Alimentación
Agencia de Recursos Naturales y Recaudación de Impuestos
Servicio de Inspección a la Alimentación

Pruebas de Laboratorio

Suero:		Hisopados:	
FMD 3ABC ELISA	negativo	Aislamiento viral-	
VSV NJ Ab ELISA	negativo	MCF AHV 1-2 rPCR-	
VSV IND1 Ab ELISA	negativo	MCF OHV 2 rPCR-	
BT ELISA	negativo		
EHD AGID	negativo		
MCF IP	negativo		

Recomendación

**Separar ovejas y cabras de las vacas.
Incluso corderos muy sanos y jóvenes
son portadores del OHV2.**

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFOSA - Salud Pública Veterinaria

Ministerio de Agricultura y Recursos Naturales
Agencia de Fiebre Aftosa y Brucellosis
Panamericana de Estados Unidos

USDA
Peces y Productos Animales
Agencia de Fiebre Aftosa y Brucellosis
Panamericana de Estados Unidos

Fiebre Catarral Maligna

- Experiencia en US
 - Detección clínica y derivación de los casos
- Diagnóstico
 - Fotos de casos clínicos
 - Procedimientos
 - Tipo de muestras
 - Técnicas molecular, serológicas y patológicas

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFOSA - Salud Pública Veterinaria

Ministerio de Agricultura y Recursos Naturales
Agencia de Fiebre Aftosa y Brucellosis
Panamericana de Estados Unidos

USDA
Peces y Productos Animales
Agencia de Fiebre Aftosa y Brucellosis
Panamericana de Estados Unidos

Fiebre Catarral Maligna

- Experiencia en US
 - Detección clínica y derivación de los casos
- Diagnóstico
 - Fotos de casos clínicos
 - Tipo de muestras
 - Problemas/soluciones
 - Técnicas molecular, serológicas y patológicas

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFOSA - Salud Pública Veterinaria

USDA
Peces y Productos Animales
Agencia de Fiebre Aftosa y Brucellosis
Panamericana de Estados Unidos

Procedimientos

- Aviso al Veterinario Oficial de la región
- Visita en la granja
- Observación y diagnóstico clínico
- Aviso al Veterinario APHIS
- Coordinación entre el Veterinario APHIS a FADDL
- Asignación de caso FAD y prioridad
- Toma de muestras y envío FedEx o UPS
- Algoritmo de muestras para vesiculares
- Reporte de resultados en LIMS

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFOSA - Salud Pública Veterinaria

Ministerio de Agricultura y Recursos Naturales
Agencia de Fiebre Aftosa y Brucellosis
Panamericana de Estados Unidos

USDA
Peces y Productos Animales
Agencia de Fiebre Aftosa y Brucellosis
Panamericana de Estados Unidos

Fiebre Catarral Maligna

- Experiencia en US
 - Detección clínica y derivación de los casos
- Diagnóstico
 - Fotos de casos clínicos
 - Procedimientos
 - Tipo de muestras
 - Técnicas molecular, serológicas y patológicas

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFOSA - Salud Pública Veterinaria

Ministerio de Agricultura y Recursos Naturales
Agencia de Fiebre Aftosa y Brucellosis
Panamericana de Estados Unidos

Tipo de Muestras

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Suero • Sangre completa • PBLMs • Nódulos linfáticos • Pulmón • Bazo • Hígado • Riñón • Conjuntiva • Lesiones en mucosas y/o piel |
| <ul style="list-style-type: none"> • Congelados • Refrigerados |
| <ul style="list-style-type: none"> • In vivo • Necropsia |

USDA
Peces y Productos Animales
Agencia de Fiebre Aftosa y Brucellosis
Panamericana de Estados Unidos

Fiebre Catarral Maligna

- Experiencia en US
 - Detección clínica y derivación de los casos
- Diagnóstico
 - Fotos de casos clínicos
 - Procedimientos
 - Tipo de muestras
 - Técnicas molecular, serológicas y patológicas

Centro Panamericano de Fiebre Aflosa
PANAFTOZA - Salud Pública Veterinaria

Ministerio de Recursos Naturales y Ambiente
Agencia para la Protección de la Biodiversidad
Panamericana de Biotecnología
USDA

Histopatología (IFA/IPT)

IPT (WI-BPA-0039.02)

- Sección de tejido o cámara de células infectadas
- Suero problema diluido 1:20 y 1:100
- Se cubre la sección de tejido con las diluciones de suero
- Se incuba en cámara húmeda a 37°C durante 30-35 minutos
- Se lava y se incuba con el conjugado de peroxidasa anti-proteína G (10-1223 ZYMED) durante 20-30 minutos
- Se incuba con el substrato AEC (SK-4200, vector) durante 8-10 minutos
- Se lava y seca para observar al microscopio



Centro Panamericano de Fiebre Aflosa
PANAFTOZA - Salud Pública Veterinaria

Ministerio de Recursos Naturales y Ambiente
Agencia para la Protección de la Biodiversidad
Panamericana de Biotecnología
USDA

CONTROLES

— Positivos de amplificación:

- AHV-1 : DNA extraído de sobrenadante de cultivo celular, tejido de órganos o PBLs de animal experimentalmente infectado con AHV-1
- OHV-2 : DNA extraído de tejido de órganos o PBLs de animal experimentalmente infectado con OHV-2

— Positivos de extracción:

- Actina : DNA procedente de tejido de órganos o PBLs de un animal no infectado con MCF

— Negativo:

- Agua en vez de DNA

Centro Panamericano de Fiebre Aflosa
PANAFTOZA - Salud Pública Veterinaria

Ministerio de Recursos Naturales y Ambiente
Agencia para la Protección de la Biodiversidad
Panamericana de Biotecnología
USDA

Técnicas de Diagnóstico

Detección de Anticuerpos

- VNT
- I Blotting
- ELISA y cELISA
- CF

Detección de Antigenos

- IHQ (IFA/IPT)
- Aislamiento Viral*

PCR

Debido a la prolífica presencia de anticuerpos y la falta de diferenciación entre los diferentes miembros del grupo de MCF la serología no es un método muy recomendado para diagnóstico

Centro Panamericano de Fiebre Aflosa
PANAFTOZA - Salud Pública Veterinaria

Ministerio de Recursos Naturales y Ambiente
Agencia para la Protección de la Biodiversidad
Panamericana de Biotecnología
USDA

PCR

Polymerase Chain Reaction for the Detection of Nucleic Acids for the Malignant Catarrhal Fever AHV-1 Virus and OHV-2 Virus

- BPSOP1501.01

Real-time Polymerase Chain Reaction for the Detection of Nucleic Acids for the Malignant Catarrhal Fever AHV-1 &2 and OHV-2 Viruses

- SOP-DS-0060

Centro Panamericano de Fiebre Aflosa
PANAFTOZA - Salud Pública Veterinaria

Ministerio de Recursos Naturales y Ambiente
Agencia para la Protección de la Biodiversidad
Panamericana de Biotecnología
USDA

Extracción del DNA

• Protocolo BPFMB1501 (SOP-DS-0031/SOP-DS-0048)

- Búfer de lisis celular
- Proteinasa K
- Solución de precipitación de proteínas
- Tratamiento con Isopropanol de la fase acuosa donde queda el DNA suspendido
- Precipitación y re suspensión del DNA en 0.1 ml volumen final

Centro Panamericano de Fiebre Aflosa
PANAFTOZA - Salud Pública Veterinaria

Ministerio de Recursos Naturales y Ambiente
Agencia para la Protección de la Biodiversidad
Panamericana de Biotecnología
USDA

Polymerase Chain Reaction for the Detection of Nucleic Acids for the Malignant Catarrhal Fever AHV-1 Virus and OHV-2 Virus

- BPSOP1501.01

Real-time Polymerase Chain Reaction for the Detection of Nucleic Acids for the Malignant Catarrhal Fever AHV-1 &2 and OHV-2 Viruses

PCR ANIDADO (NESTED-PCR)

SOP-DS-0060

Centro Panamericano de Fiebre Aflosa
PANAFTOZA - Salud Pública Veterinaria

USDA

Cebadores/Primers

Katz f1	5'-TCG TCA GTA AAC AGC CTG CTG GTG
Katz f2	5'-GGT ACA GAC AAG TCT CTT CCC
Katz ss 1	5'-GTT GCT CTA AGA ACA CAT CGG TGC C
Katz ss 2	5'-ATC TAC AGC CCC TCA AAG CCA TTC
Hsu f1	5'-CCA GAC GCT ATC AGA TGA CG
Hsu f2	5'-CTG TCC TGT TGT TGT TGT TGT TGT GA
Hsu ss 1	5'-CTG TCG TCT GGT TGT CTT CG
Hsu ss 2	5'-GAG CGA AGG TGT CTG TTG TG
OHV-2 f1	5'-ATG AAC TCA GAG GGC TCT CG
OHV-2 f2	5'-ATA ATC AGG AAG GTG GTG CT
OHV-2 ss1	5'-CCA GAT GGC TCT CGG TTA GG
OHV-2 ss2	5'-CTA CGC GGC TCT CGG TTA GG
Actin 1	5'-CCA GAC AGC ACT GTG TIG G
Actin 2	5'-AGA AGC TGT GCT AGG TCG C

Centro Panamericano de Fiebre Aflosa
PANAFTOZA - Salud Pública Veterinaria

USDA

PCR

- Master mix (45 ul/rx) a cada tubo
- Cerrar los tubos y llevarlos a la zona de DNA
- Añadir 5 ul de cada muestra de DNA
- Cerrar y correr el programa para PCR

Componente	Stock concentration	Reaction concentration	FS reaction volume (μl)	SS reaction volume (μl)
f31 or ss1 primer	8 μM	0.4 μM	2.5	2.5
f21 or ss2 primer	8 μM	0.4 μM	2.5	2.5
Water	NA	NA	16.75	20.25
Glicerol	50%		10	10
10X buffer	1X		5	5
MgCl ₂	25 mM	2.0 mM	4	4
dNTP	10 mM	200 μM	4	4
Amplicon Gold	5 Units	1.25 Units	25	25
Total Volume			45	48.5

Sostenido a 95°C por 9 minutos
40 ciclos:
94°C por 25 segundos
60°C por 25 segundos
73°C por 45 segundos

Sostenido a 73°C por 3 minutos

Centro Panamericano de Fiebre Aflosa
PANAFTOZA - Salud Pública Veterinaria

USDA

Resultados

	Producto primera reaccion (bp)	Producto segunda reaccion (bp)
Actina	357	NA
Katz/AHV-1	487	172
Hsu/AHV-1	1,069	627
OHV-2	347	243

Centro Panamericano de Fiebre Aflosa
PANAFTOZA - Salud Pública Veterinaria

USDA

Polymerase Chain Reaction for the Detection of Nucleic Acids for the Malignant Catarrhal Fever AHV-1 Virus and OHV-2 Virus

- BPSOP1501.01

Real-time Polymerase Chain Reaction for the Detection of Nucleic Acids for the Malignant Catarrhal Fever AHV-1 &2 and OHV-2 Viruses

SOP-DS-0060

Centro Panamericano de Fiebre Aflosa
PANAFTOZA - Salud Pública Veterinaria

USDA

Cebadores/Primers

Primer name	5'-3' sequence	5'-Reporter	3'-Quencher
MCF-mF	CACACCCAACTGGAGTATGAC		
MCF-mR	ATGTGTAGTGCGGCAGTC		
OHV-2p	ATGTCGCGCTTCGACCCCTC	FAM	IA Black FQ
AHV-1p	TCGGTGGGTGACATTCAATA	Cy3	BHQ
AHV-2p	CACGGTAAACAGCATCCACTAT	Cy5	BHQ

Centro Panamericano de Fiebre Aflosa
PANAFTOZA - Salud Pública Veterinaria

USDA

PCR

- Master mix (23 ul/rx) a cada tubo (Smart Cycler II)
- Cerrar los tubos y llevarlos a la zona de DNA
- Añadir 2 ul de cada muestra de DNA
- Cerrar y correr el programa para PCR

component	Stock conc.	Final conc.	Reaction vol.
H2O	N/A	N/A	4.3 ul
2x Express Universal Mix	2X	1X	12.5 ul
MCF Fw primer	20 uM	400 nM	0.5 ul
MCF Rv primer	20 uM	400 nM	0.5 ul
AHV-2 Cy3 probe	5 uM	200 nM	1
AHV-2 Cy5 probe	5 uM	800 nM	4
OHV-2 FAM probe	5uM	200 nM	0.2 ul
Final volume			23 ul

Sostenido a 50C durante 2 minutos
Sostenido a 95C durante 2 minutos
45 ciclos:

95C durante 15 segundos
60C durante 30 segundos

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOSA - Salud Pública Veterinaria



Resultados

- Los controles positivos deben cruzar el límite de positividad antes del ciclo 32ct
- Actina tiene que ser positiva
- Toda muestra que cruce el límite de positividad antes del ciclo 40 ct es considerada

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOSA - Salud Pública Veterinaria



Referencias

- Baxter, SJF, Pow I, Bridgen A, Reid HIV (1993) PCR detection of the sheep-associated agent of malignant catarrhal fever. Arch Virol 132:145-159.
- Hsu D, Shih LM, Zee YC (1990) Nucleotide sequence of a 3.5 kilobase fragment of malignant catarrhal fever virus strain WC11. Arch Virol 113: 53-60.
- Hsu D, Shih LM, Castro AE, Zee YC (1990) A diagnostic method to detect alcelaphine herpesvirus-1 of malignant catarrhal fever using the polymerase chain reaction. Arch Virol 114: 259-263.
- Katz J, Seal B, Ridpath J (1991) Molecular diagnosis of alcelaphine herpesvirus (malignant catarrhal fever) infections by nested amplification of viral DNA in bovine buffy coat specimens. J Vet Diagn Invest 3: 193-198.
- Suarez DL, Van der Maaten MJ, Whetstone CA (1995) Improved early and long-term detection of bovine lentivirus by a nested polymerase chain reaction test in experimentally infected calves. Am J Vet Res 56(5): 579-586.

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFTOSA - Salud Pública Veterinaria



FADDL-DSS Team

- Karen Moran
- Emily O'Hearn
- Kate Schumann
- Harrison Bergeron
- Heather Petrowski
- Alexa Bracht
- Andrew Fabian
- Marylou Berninger
- Karissa Lemire
- Fawzi Mohamed
- Gregory May
- Consuelo Carrillo
- Karyn Havas

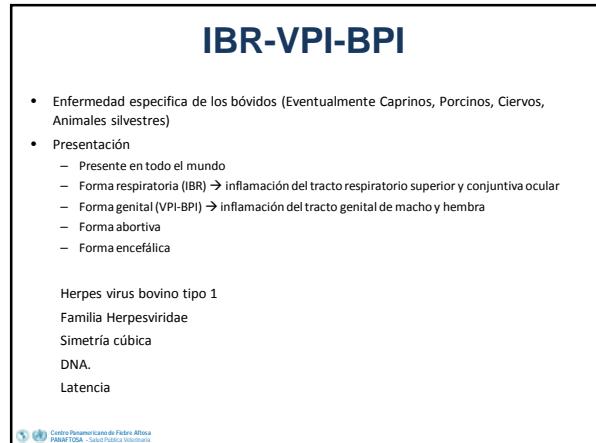
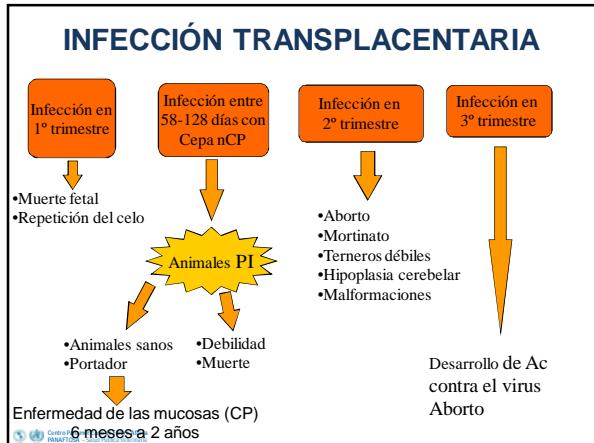
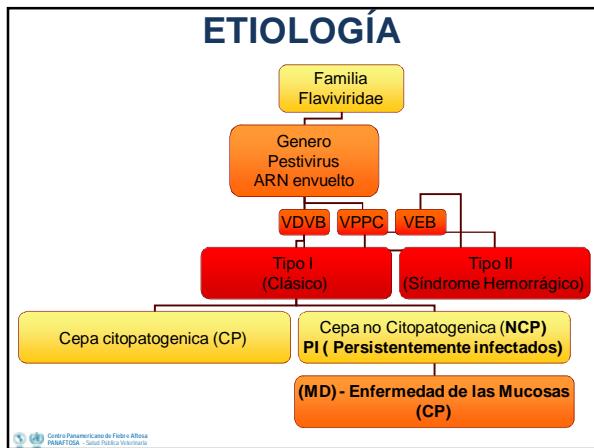


www.paho.org/panaftosa



Twitter/panaftosa_inf Facebook/kmcPANAFTOSA

**RINOTRAQUEITI INFECCIOSA BOVINA (IBR)
DIARREA VIRAL BOVINA (BVD)**



PCR - DVB			
ANEXO FA) ESTIMACIÓN VOLUMEN REACTIVO			
Fechas	09-03-2017		
Análisis	RT-PCR DVB		
Operador	JF R		
Nº Muestra	1		
	MATERIAL DE REACCIÓN		
	µl por 1 reacción	µl por X reacciones	
DNA/RNA			Cuant. Real
Agua destilada	12.5	68.75	1x
25pmol de Partidón 1	0.5	2.75	0.4 uM (10pmol)
25pmol de Partidón 2	0.75	4.125	0.4 uM (10pmol)
2.5 pmol dNTP	2.5	13.75	0.12 uM
2.5 Ucatalasa Bio	0.25	1.25	4.00 U
H ₂ O	8	0	
Sobr total	17	93.5	
Concentrado RNA		14	
Total	20	117.5	

PCR - DVB			
	100°C	55°C	72°C
	10 min	30 sec	1 min
	10 min	30 sec	1 min
Incubación			
Primer RT	1	10 min	45°C
	1	10 min	95°C
	45	1 min	100°C
	45	1 min	95°C

Referencia			
Dosis de los testigos (ByDV y ECV) by Real Time short target PCR			
IF	Muestra	Prototípico	CT
	33	2043	2369
	34	2043	2354
• H ₂ O (Gómez), Antibiot. /			

A screenshot of a computer screen displaying a product page from the Thermo Fisher website. The page is titled "VetMAX™-Gold BVDV PI Detection Kit". It features a product image, a catalog number (4413938), and several tabs for "General Product", "Description", "Specifications", and "Downloads". The "Downloads" tab is currently selected, showing links to "Product Manual", "Safety Data Sheet", and "Brochure". The bottom of the screen shows a standard Windows taskbar with icons for the Start button, File Explorer, Task View, and other open applications.

ELISA - IBR

Laboratorio de Biología y Análisis de la Salud Animal y Bacteriológica

Rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR)/ Herpesvirus-1 bovino (BHV-1)

La rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR) es una enfermedad infecciosa altamente contagiosa causada por el virus del herpesvirus-1 bovino (BHV-1). Los animales infectados respiran con dificultad, cosa que puede causar inmovilidad, alergia, moco nasal y secreciones oculares. Los animales infectados suelen presentar una actividad menor y perder su peso rápidamente que los de IBR, simple rinitis. La enfermedad se transmite entre los animales a través del contacto directo o indirecto, así como mediante el condensado de las lágrimas para identificar una cepa por IBR-1. La vacunación es la mejor forma de controlar la enfermedad. Los anticuerpos en suero, plasma o leche. Los pruebas que tienen programas de desarrollo y validación para detectar anticuerpos en suero, plasma o leche para IBR-1 están siendo preparadas. Se realizan pruebas paralelas de IBR europeas y procedimientos de prueba que se evalúan en Italia.

Pruebas disponibles*

ELISA

Prueba IBR/2 IBR gB IgG +
Sensibilidad/Exactitud: Fuera de los EE.UU.

Prueba IBR/2 IBR gB IgA +
Sensibilidad/Exactitud: Fuera de los EE.UU.

La prueba IBR/2 IBR gB IgG es un ensayo inmunoabsorbente líquido a temperatura (ELISA) para la detección de anticuerpos inmunodifusivos frente a la glucoproteína B del herpesvirus bovino en suero y en muestra suave analizada in vitro.

Prueba IBR/2 IBR gB IgA +
Sensibilidad/Exactitud: Fuera de los EE.UU.

La prueba IBR/2 IBR gB IgA es un ensayo inmunoabsorbente líquido a temperatura (ELISA) para la detección de anticuerpos inmunodifusivos frente a la glucoproteína B del herpesvirus bovino en suero y en muestra suave analizada in vitro.

También ofrecemos:

Evaluación canina:
Inmunidad para parvovirus (PPV)
Cárcel de vacas
Cárcel de cerdos
Inmunidad del lechón (Lepto)
Inmunidad de la leche

Centro de referencias:

Españoles (Alberca para animales enfermizos)

En línea y remota por teléfono:
Evaluación por teléfono (EE.UU.)
Evaluación por teléfono (Europa)

Materiales de Referencia:

Evaluación por teléfono (EE.UU.)
Evaluación por teléfono (Europa)

Internacional de Recursos:

Inglés:
Frances:
Italiano:
Español: Latinoamérica
Portugués: Iberia
Chino: Simplificado
Otro: Francés

ELISA - IBR

PCR IBR

appliedbiosystems
INSTRUCTIONS FOR USE

VetMAX™ IBR gB Kit

Real-time PCR TaqMan® for detection of BHV1 (Bovine Herpes Virus type 1)

Catalog Number IBR/P50
Doc. Part No.: 10902375 Pub. No.: MAMBI070 Rev. 0.0

Technology	Species	Method and isolated from matrices:	Test type
TaqMan® PCR	Bovine	Fecal sample	Qualitative
-RT	Bovine	Fecal sample	Qualitative
• Endogenous (EC)	Bovine	Serum	Qualitative

WARNING! Read the Safety Data Sheets (SDSs) and follow the handling instructions. Wear appropriate protective eyewear, clothing, and gloves. Safety Data Sheets (SDSs) are available from [thermofisher.com/us/en/home/healthcare-safety-and-environment/safety-data-sheets.html](http://www.thermofisher.com/us/en/home/healthcare-safety-and-environment/safety-data-sheets.html).

WARNING! POTENTIAL BIOMATERIAL: Read the biological hazard safety information at this product's page at [thermofisher.com/us/en/home/healthcare-safety-and-environment/biological-hazard-safety-information.html](http://www.thermofisher.com/us/en/home/healthcare-safety-and-environment/biological-hazard-safety-information.html). Wear appropriate protective eyewear, clothing, and gloves.

Information about the product

Description of the product

The VetMAX™ IBR gB Kit is a molecular diagnostic test that provides definitive diagnosis by qualitative PCR of bovine viral Herpes Virus type 1 (IBR) targeting the gene encoding for gB protein. It can be used in cases of respiratory disease associated with IBR (Infectious Bovine Rhinotracheitis), but it does not enable detection of bovine herpesvirus 2 (BHV-2).

Each PCR reaction is performed after extraction as analyzed in a singlewell plate; the same plate is used to specifically detect the total DNA of BHV1 and to assess the PCR thermal cycling conditions. A positive PCR reflects both the efficiency of extraction and the absence of inhibitors in the samples.

It can be used with total DNA extracted from nasal swabs, pulmonary lavage, and serum.

Complete instructions for total DNA extraction from these sources are available on request from Technical Support.

Kit contents and storage

The VetMAX™ IBR gB Kit contains reagents for detection in duplex of BHV1 and an internal positive control (IPC). Upon receipt, the whole kit must be stored between -20°C and -40°C. After initial use of a component, store it according to the following:

• 2. Wolf G. The perfect BVDV diagnosis? En actas del Symposium on Diagnosis of BVDV in Ear Notch Samples. Stendal, Alemania. 2007.

• 3. van Maanen C. Deventer Validation Report-Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) Antigen Detecting EUAs. Deventer, Holanda. Servicio de Sanidad Animal, 2001.

• 4. IDEXX Laboratories. Bovine Viral Diarrhea Virus Antigen Serum/Plus Test Kit Validation Data Report. Westbrook, Maine. 2005. Disponible en los archivos de IDEXX Laboratories, Inc.

• <http://www.thermofisher.com/us/en/home/healthcare-safety-and-environment/biological-hazard-safety-information.html> (04/2013)

• <http://www.thermofisher.com/us/en/home/healthcare-safety-and-environment/safety-data-sheets.html> (04/2013)

• <http://www.thermofisher.com/us/en/home/healthcare-safety-and-environment/biological-hazard-safety-information.html> (04/2013)

• Ridpath JF. 2003. BVDV genotypes and biotypes: practical implications for diagnosis and control. *Biologicals*31, 127-131.

• Ridpath JF, SR Bolin, EJ Dubovi. 1994. Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes. *Virology*205, 66-74.

• Ridpath JF, JD Neill, M Frey, JS Landgraf. 2000. Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV from North America. *Vet Microbiol* 77, 145-155.

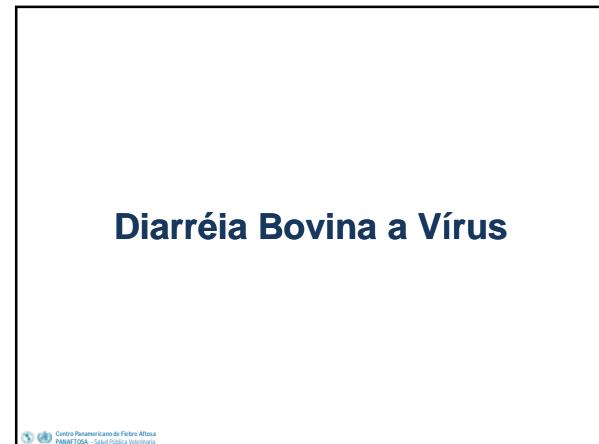
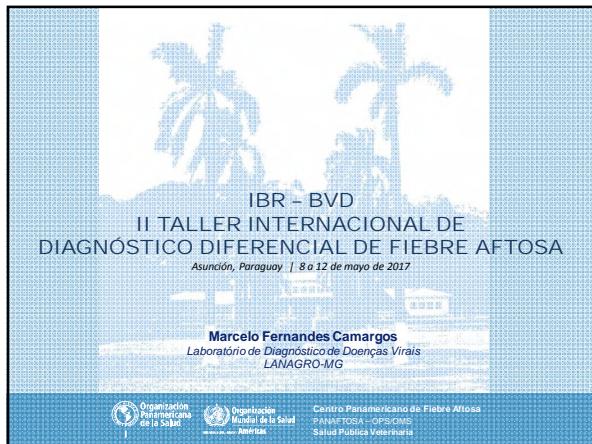
• Vilcek S, S Belák. 1996. Genetic identification of pestivirus strain Fritjers as a border disease virus from pigs. *J Virol Methods* 60, 103-108.

• Vilcek S, AJ Herring, PF Nettleton, JP Lowings, DJ Paton. 1994. Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch Virol* 136, 309-323.

www.paho.org/panaftosa



Twitter/[panaftosa_inf](#) Facebook/[kmcPANAFTOSA](#)

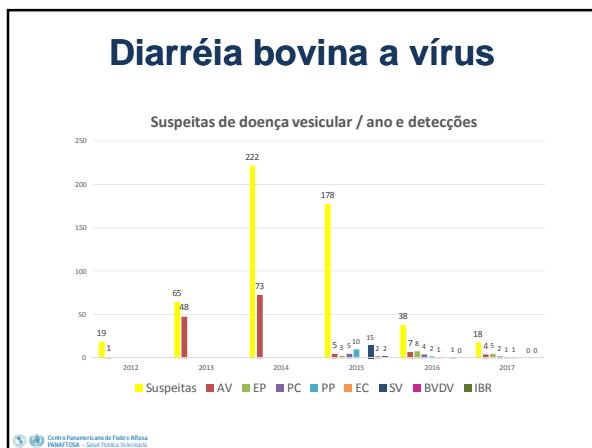
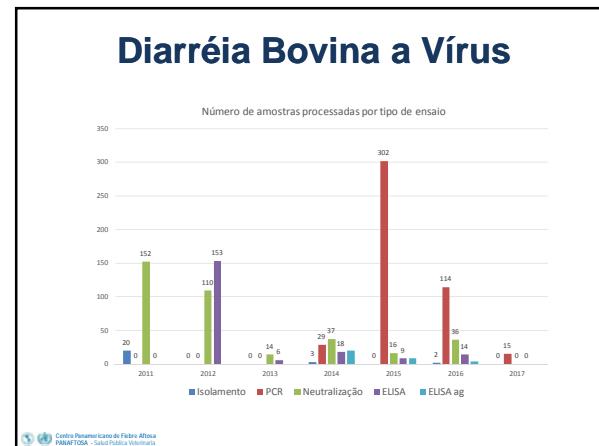


Diarréia Bovina a Vírus

Diagnóstico clínico

- Bezerro de 8 meses;
- Apatia, emagrecimento progressivo;
- Erosões/ulcerações na mucosa oral (lábios e língua)/nasal. Formato circular, 0,5-1 cm de diâmetro com aspecto sanguinolento;
- Diarréia de cor escura;
- 40,7 °C;
- Sialorréia

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFOSA - Salud Pública Veterinaria



Diarréia Bovina a Vírus

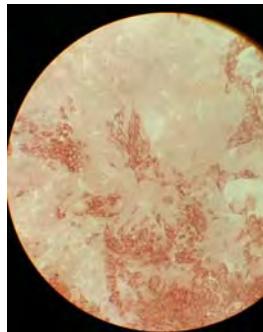
Diagnóstico laboratorial

- Amostras: sangue total, soro, suabe, sêmen, fragmentos de orelha, baço, fígado, pulmão, rins, linfonodos, timo etc.
- Qualidade insumos (células, SFB);
- Isolamento: protocolos variados;
 - Tecidos;
 - Swabs = agitar, centrifugar, coletar o sobrenadante, filtrar, inocular.
- Sangue total = água + PBS, centrifugar, ressuspender o precipitado, inocular.
- Sêmen = diluir em SFB, centrifugar (optativo) e inocular;
- Soro = em microplacas.

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PANAFOSA - Salud Pública Veterinaria

Diarréia Bovina a Vírus

Diagnóstico laboratorial



Centro Panamericano de Febre Aftosa
PANAFTOXA - Saúde Pública Veterinária

Diarréia Bovina a Vírus

Diagnóstico laboratorial

- ELISA para antígenos
 - Idexx Ems
 - Mabs na placa;
 - Soro, plasma, sangue total e fragmentos orelha;
 - Apenas os fragmentos tem de ser lisados;
 - Custo

Centro Panamericano de Febre Aftosa
PANAFTOXA - Saúde Pública Veterinária

Diarréia Bovina a Vírus

Diagnóstico laboratorial

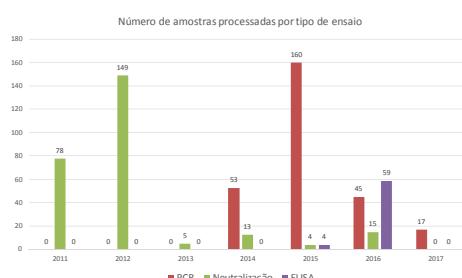
- Diagnóstico sorológico
 - Elisa Idexx (bovinos);
 - Neutralização viral
 - Ponto de corte 8;
 - 30-300 TCID₅₀ Singer;
 - 15.000 cél. MDBK / poço
 - 72 a 96 horas de incubação

Centro Panamericano de Febre Aftosa
PANAFTOXA - Saúde Pública Veterinária

Rinotraqueíte infecciosa bovina

Centro Panamericano de Febre Aftosa
PANAFTOXA - Saúde Pública Veterinária

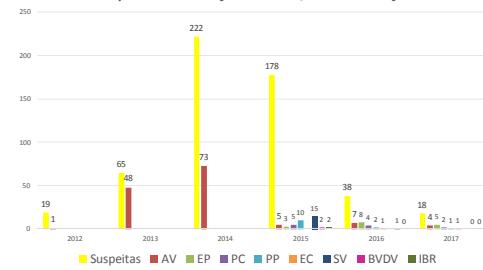
Rinotraqueíte infecciosa bovina



Centro Panamericano de Febre Aftosa
PANAFTOXA - Saúde Pública Veterinária

Rinotraqueíte infecciosa bovina

Suspeitas de doença vesicular / ano e detecções



Centro Panamericano de Febre Aftosa
PANAFTOXA - Saúde Pública Veterinária

Rinotraqueíte infecciosa bovina

Diagnóstico laboratorial

- Isolamento de vírus
 - Amostras: suave nasal ou genital, lavado prepucial, fragmentos mucosa respiratória, tonsila, pulmão, linfonodos, feto abortado.
- Sorológico (ELISA / NV)
 - Ponto de corte 2;
 - 30-300 TCID₅₀ ED6;
 - Incubação vírus x soro 24 horas em estufa;
 - 30.000 cél. MDBK / poço
 - 72 a 96 horas de incubação

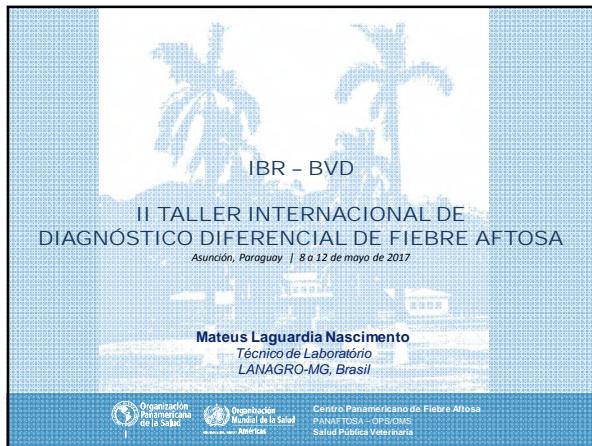
 Centro Panamericano de Física e Alimentação
CENPAFTOSA - Centro Técnico Interamericano

www.paho.org/panaftosa



marcelo.camargos@agricultura.gov.br

 PAHO PANAFTOSA - Salud Pública Veterinaria



IBR

- Endêmica no Brasil
- Diagnóstico diferencial de Febre Aftosa
- Dificuldade:
 - Animais com infecção latente
 - Vírus reativa em casos de estresse

Centro Panamericano de Febre Aftosa
CPAFO/FOSEA - Salud Pública Veterinaria

IBR

- Achados no Brasil:

Detection of multiple viral infections in cattle and buffalo with suspected vesicular disease in Brazil

Mateus Laguardia-Nascimento, Erica Braga-Silva, Marcella Ribeiro Gasparrini, Nádia Mendes de Souza, Josiane Aparecida Gonçalves da Silva, Ana Lucia Vaz e Andrade, Renata Barreto Crivell, Alano Pignatello dos Santos, Anderson Vassouras Rezende Júnior, Mário Fernando Cunha, Ambulante Augusto Fonseca Júnior*

*Morbidity, Vesicular disease is of high importance for livestock, primarily because of foot and mouth disease (FMD), which is a highly contagious disease that causes direct losses related to milk production, weight loss, and indirect impacts because of the need for sanitary barriers. Other vesicular diseases are also of importance for livestock because of their impact on trade. In Brazil, there are three main types of vesicular diseases: foot-and-mouth disease (FMD), bovine papular stomatitis (BPS), and bovine herpesvirus 1 (BHV-1). These three agents are highly pathogenic for cattle and buffalo. They cause significant economic losses in the Americas. Among these three agents, BHV-1 is the most important for cattle and buffalo. All samples from MT were positive for parapoxvirus (Pseudocowpox virus and Bovine papular stomatitis virus). In addition, 3 samples were positive for Bluetongue virus, and 5 samples were positive for Bovine herpesvirus 1. Among these samples, 1 was positive for all of these 3 agents.

All samples from MT were positive for parapoxvirus (Pseudocowpox virus and Bovine papular stomatitis virus). In addition, 3 samples were positive for Bluetongue virus, and 5 samples were positive for Bovine herpesvirus 1. Among these samples, 1 was positive for all of these 3 agents.

Among these samples, 1 was positive for all of these 3 agents. Only 2 samples from AM were negative for parapoxvirus. This evidence that evidence of other three agents, BHV-1, BPS and FMD, are present in the samples.

Centro Panamericano de Febre Aftosa
CPAFO/FOSEA - Salud Pública Veterinaria

BVD

- Diagnóstico diferencial de Febre Aftosa e Peste Suína Clássica
- Contaminação de cultivos celulares
 - Possíveis problemas com vacinas
- Dificuldades no diagnóstico: 3 subtipos com significativas diferenças entre si
 - Dificuldade em encontrar apenas um par de iniciadores para todos os subtipos

Centro Panamericano de Febre Aftosa
CPAFO/FOSEA - Salud Pública Veterinaria

BVD

- Solução: região extremamente conservada
 - Região amplificada: 5' UTR
 - Amplifica também outros Pestivirus
 - Necessita, em caso de positividade, de outras rodadas de PCR para confirmação e identificação do subtipo

Centro Panamericano de Febre Aftosa
CPAFO/FOSEA - Salud Pública Veterinaria

BVD

- PCRs para tipificação
 - Nested:
 - Externa: 5' UTR, 1013 pb
 - Interna:
 - BVDV-1: 501 pb
 - BVDV-2: 829 pb
 - BVDV-3: 210 pb
 - Dificuldade: Ausência de BVDV-3 para padronização

Centro Panamericano de Febre Aftosa
CPAFO/FOSEA - Salud Pública Veterinaria

BVD

- PCRs para tipificação

- PCR Convencional:

- Região amplificada: 5' UTR
- Não é capaz de amplificar o BVDV-3

 Centro Panamericano de Febre Aftosa
CPFA - Centro de Referência da OIE

BVD

Biologicals 41 (2011) 407-414



Detection of contaminants in cell cultures, sera and trypsin

Tatiana Flávia Pinheiro de Oliveira ^a, Antônio Augusto Fonseca Jr. ^a,
Marcelo Fernandes Camaros ^b, Anapolino Macedo de Oliveira ^a,
Ana Cláudia Pinto Cottorello ^b, Antonizete dos Reis Souza ^b, Iassudara Garcia de Almeida ^a,
Marcos Bryan Heinemann ^{b,c}

^a Laboratório de Biologia Molecular, Laboratório de Diagnóstico de Doenças Virais, Laboratório Núcleo de Agropecuária de Minas Gerais, Pedro Leopoldo,
Minas Gerais, Brazil

^b Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil



BVD

- Detecção de BVDV:

- Em linhagens celulares:
 - 88 testadas, 21 positivas (23,9%)
- Em Soro Fetal Bovino:
 - 13 amostras testadas, 2 positivas (15,4%)
- Em Tripsina:
 - 10 amostras testadas, 0 positivas
 - Em uma amostra havia contaminação por PCV-1

 Centro Panamericano de Febre Aftosa
CPFA - Centro de Referência da OIE

www.paho.org/panaftosa



mateus.nascimento@agricultura.gov.br

[Twitter/panaftosa_inf](https://twitter.com/panaftosa_inf) [Facebook/kmcPANAFTOSA](https://facebook.com/kmcPANAFTOSA)

INFRAESTRUCTURA DE LABORATORIOS

A large, faint background image of two palm trees on a sandy beach under a clear blue sky.

DISCUSION DE PLENARIO

Infraestructura de laboratorios para diagnóstico diferencial de Fiebre Aftosa



Experiencias en la Región

Infraestructura de laboratorios para diagnóstico diferencial

Riesgos biológicos: posible exposición a microorganismos o sus productos (ej. toxinas) que puedan dar lugar a enfermedades, motivada por la actividad laboral.

Grupos de riesgos de microrganismos: 1, 2, 3, 4

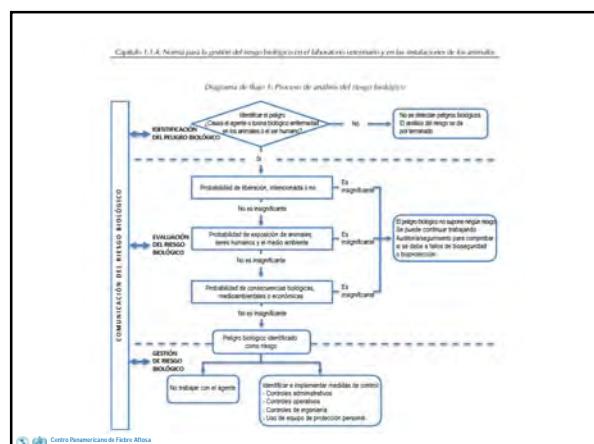
Niveles de Bioseguridad de Laboratorios : NSB 1, NSB2, NSB 3, NSB4

No hay una equivalencia entre estos grupos de riesgo y los niveles de seguridad biológica. Debe basarse en una **Evaluación de Riesgo**.

Las **evaluaciones del riesgo** de laboratorio sirven para determinar las medidas de bioseguridad y bioprotección específicas que serán necesarias para contener y trabajar de manera segura con agentes y toxinas biológicos específicos en un laboratorio o instalación que albergue animales.

"El sistema de clasificación en estos niveles de bioseguridad se ha cuestionado porque no se emplean normas ni definiciones internacionalmente válidas y, por lo tanto, la comparación entre laboratorios con los sistemas de clasificación numéricos propios de cada país no puede ser equivalente ni representativa." (Manual terrestre OIE Capítulo 1.1.4, 2015).

Infraestructura de laboratorios para diagnóstico diferencial



NB: Versión adoptada por la Asamblea Mundial de Delegados de la OIE en mayo de 2015

APÉNDICE 1 - 4 - 2.

ASPECTOS A TENER EN CUENTA AL EVALUAR EL RIESGO BIOLÓGICO Y AL DISEÑAR LAS MEDIDAS DE CONTROL

En el Capítulo 2.5 Gestión del riesgo biológico: ejemplos de asignación de estrategias de gestión del riesgo a los riesgos biológicos detectados se proporcionan ejemplos ilustrativos de evaluaciones del riesgo y de las estrategias y medidas de control.

Aspectos a tener en cuenta en la identificación y evaluación del riesgo biológico	Determinantes o nivel de riesgo de liberación o escape del agente biológico	Ejemplos de medidas de control del riesgo biológico
La existencia del agente biológico; las vías de liberación, propagación y escape; las vías de propagación y escape; las interacciones entre los agentes patógenos; el riesgo de propagación y escape.	Lanzamiento de microorganismos (microorganismos patógenos que causan enfermedades, virus de transmisión respiratoria, bacterias, hongos, virus de transmisión alimentaria, virus de transmisión animal, virus de transmisión humana, virus de transmisión animal y humano).	Cada vía de liberación requiere una medida de mitigación específica. Por ejemplo, para las vías de liberación y escape de virus de transmisión respiratoria se deben aplicar las prácticas de bioseguridad más estrictas. La liberación de virus de transmisión alimentaria requiere la aplicación de procedimientos de bioseguridad más estrictos que las de liberación de virus de transmisión humana.
El origen del agente fuera del hospedador.	El origen de las infecciones: las infecciones procedentes de fuentes naturales (animales, plantas, suelo, agua, polvos, insectos, etc.) y las procedentes de fuentes artificiales (humano, laboratorio, etc.).	Concentración de superpoblaciones de virus de transmisión animal y humano, así como de virus de transmisión animal y humano que no se han transmitido a través de las interacciones con las personas. La liberación de virus de transmisión animal y humano que no se han transmitido a través de las interacciones con las personas.
El posible vector enfermedad humana o animal.	Riesgo alto: enfermedad que puede causar la muerte o la enfermedad permanente. Riesgo bajo: enfermedad que causa malestar temporal.	Emitir el informe del laboratorio de vigilancia de la salud pública (SVL) o el informe de vigilancia de la salud pública (IVP) o el informe de vigilancia de la salud pública y el informe de vigilancia de la salud animal (IVSA). Para el virus de la fiebre aftosa: riesgo alto para el hombre y el animal. Para las demás enfermedades: riesgo bajo para el hombre y el animal.
Riesgo moderado: en general es menor que el riesgo alto, pero tiene efectos significativos.	Aplicación de controles administrativos y de procedimientos de control de la liberación y escape de virus de transmisión animal y humano que no se han transmitido a través de las interacciones con las personas.	
Riesgo bajo: riesgo mínimal.	Aplicación de controles administrativos y de procedimientos efectivos de control de la liberación y escape de virus de transmisión animal y humano que no se han transmitido a través de las interacciones con las personas.	

Manual Terrestre de la OIE 2015
Sistema de Evaluación del Riesgo Biológico

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa PANAFTOZA - Salud Pública Veterinaria

PARAGUAY



LABORATORIO DE BIOSEGURIDAD NSB3A - NB4OIE
ORGILFREDO COMPASSI DARSIE

EL LABORATORIO DEL SENACSA CUENTA CON UN AREA DE NIVEL DE BIOSEGURIDAD NSB3A – NB4OIE
(NIVEL DE SEGURIDAD BIOLÓGICA 3 AGRICULTURA – NIVEL DE BIOSEGURIDAD 4 ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL)

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa PANAFTOZA - Salud Pública Veterinaria

LABORATORIO DE BIOSEGURIDAD NSB3A - NB4 OIE

- Fue proyectado siguiendo los Estándares de Seguridad Biológica de la OIE y considerando los requerimientos establecidos en legislaciones nacionales, regionales e internacionales.

Trabajo conjunto : **SENACSA – ACONASA - ARP**

Asesoramiento técnico del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (PANAFTOZA) y la Organización Panamericana de Salud/ (OMS/OPS), desde su diseño hasta la habilitación.

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa PANAFTOZA - Salud Pública Veterinaria

Laboratorio NSB3A – NB4OIE

SUPERFICIE:

- Superficie Total : 576,63m²
- Construida : 484,46 m²
- Inaugurada : Diciembre 2011
- Habilitada : Octubre 2012

Servicios técnicos, Monitoreo, Mantenimiento : TERCERIZADO

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa PANAFTOZA - Salud Pública Veterinaria

ÁREA BIOCONTENIDA

- ✓ Vestuarios
- ✓ Recepción de Muestras
- ✓ Equipos de Fronteras (Passthrough, Autoclave y Airlock)
- ✓ Laboratorio de Control de Calidad de Vacuna de Fiebre Aftosa
- ✓ Laboratorio de Diagnóstico de Fiebre Aftosa
- ✓ Laboratorio de Diagnóstico de Enfermedades Exóticas
- ✓ Sala de Frío
- ✓ Sala de Centrifugado.
- ✓ Sala de Microscopía.
- ✓ Salidas de Emergencia.

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa PANAFTOZA - Salud Pública Veterinaria





Centro Panamericano de Física Atómica
CENAF/FOA - Centro Nuclear Avanzado



Centro Panamericano de Física Atómica
CENAF/FOA - Centro Nuclear Avanzado



Centro Panamericano de Física Atómica
CENAF/FOA - Centro Nuclear Avanzado



DUCHAS



PASILLO INTERIOR

Centro Panamericano de Física Atómica
CENAF/FOA - Centro Nuclear Avanzado

PASSTROUGH



Autoclave de Frontera



AIRLOCK



Área CONTROL DE CALIDAD



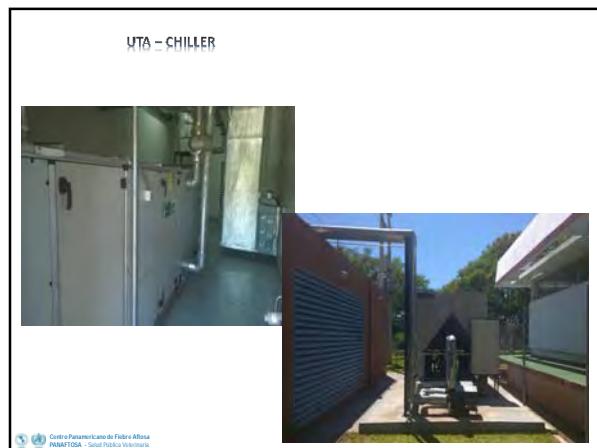
LAB. DIAGNOSTICO F. A.



LAB. DIAGNOSTICO DE ENFERMEDADES EXOTICAS-ZOONOTICAS







www.paho.org/panaftosa



[Twitter/panaftosa_inf](#) [Facebook/kmcPANAFTOSA](#)

Versión del documento y edición final por
Rossana Allende

Diagramación
Cely Ávila

Editado e impreso en junio de 2017 en el



PANAFTOSA
Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
Salud Pública Veterinaria