

# PANAFTOSA

CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA

## SEMINARIO INTERNACIONAL

El uso de herramientas  
seroepidemiológicas y virológicas  
en la vigilancia de la Fiebre Aftosa



Salud Pública Veterinaria - OPS/OMS

# INFORME FINAL

## SEMINARIO INTERNACIONAL

### El uso de herramientas seroepidemiológicas y virológicas en la vigilancia de la Fiebre Aftosa

Santiago, Chile - marzo 2003



CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA

Salud Pública Veterinaria

# CONTENIDO

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	7
<b>MÓDULO 1 - Instrumentos de diagnóstico para la vigilancia de Fiebre Aftosa</b>	
Instrumentos diagnósticos para la vigilancia de la fiebre aftosa. <i>Ingrid E. Bergmann</i> - PANAFTOSA - OPS/OMS .....	11
Pruebas serológicas y virológicas para la vigilancia activa de la fiebre aftosa. <i>Ingrid E. Bergmann, Viviana Malirat, Erika Neitzert</i> - PANAFTOSA - OPS/OMS .....	17
Epidemiología molecular en la vigilancia. <i>Viviana Malirat e Ingrid Bergmann</i> - PANAFTOSA - OPS/OMS .....	22
Generalización del uso de pruebas serológicas en base a la detección de anticuerpos contra proteínas no estructurales para la vigilancia activa. <i>Ana María Espinoza</i> - Consultora – Perú .....	26
Visión de OIE en el uso de pruebas para la detección de proteínas no estructurales en la vigilancia de fiebre aftosa <i>Alejandro Schudel</i> - Jefe del Departamento Científico y Técnico de la OIE - Office International des Épizooties - Organización Mundial de Sanidad Animal .....	29
<b>MÓDULO 2 - Instrumentos de diseño y epidemiológicos en la Vigilancia de Fiebre Aftosa</b>	
Aspectos de diseño para los estudios seroepidemiológicos de la vigilancia de Fiebre Aftosa. <i>Lic. Antonio Mendes</i> - PANAFTOSA - OPS/OMS .....	35
Una experiencia sobre la vigilancia y prevención de la Fiebre Aftosa en un país libre de Fiebre Aftosa. <i>J. Naranjo, MV., H. Rojas, MV., H. Galleguillos, MV., y ML. Dentone, MV.</i> - Departamento de Protección Pecuaria, SAG/Chile - Servicio Agrícola y Ganadero - Departamento de Protección Pecuaria .....	36
<b>MÓDULO 3 - Experiencias nacionales sobre vigilancia activa, en base al uso de pruebas serológicas y virológicas</b>	
Una experiencia sobre la vigilancia y prevención de la fiebre aftosa en un país libre de fiebre aftosa. <i>Hector Galleguillos</i> - Republica de Chile - Ministerio de Agricultura - Servicio Agrícola y Ganadero Departamento de Protección Pecuaria .....	39
Vigilancia epidemiológica de fiebre aftosa en la Republica Argentina Muestreos serológicos 2002. <i>Dr. Juan Dotta</i> - SENASA - Argentina .....	42
Investigaciones seroepidemiológicas para demostrar la ausencia de infección por virus de la fiebre aftosa: la experiencia reciente en Brasil. <i>Vitor Salvador Picão Gonçalves, PH.D.</i> - Epidemiólogo - MAPA .....	44
Investigaciones complementarias en focos de enfermedad vesicular. <i>Dra. Olga Lucía Díaz M.</i> - Coordinadora Grupo Nacional de Epidemiología Veterinaria. Instituto Colombiano Agropecuario ICA .....	46
Estudios sero-epidemiológicos para fiebre aftosa. Uruguay 2001-2002. <i>Gil, Andres</i> - MGAP, DGSG, Unidad de Epidemiología; <i>Vitale, Edgardo</i> - MGAP, DGSG, DILAVE M.C Rubino; <i>Núñez, Alvaro.</i> .....	47
<b>RESOLUCIÓN IV - Seminario Internacional sobre el uso de herramientas serológicas y virológicas en la vigilancia activa</b> .....	50
<b>AGENDA</b> .....	53



# EL USO DE HERRAMIENTAS SEROEPIDEMIOLOGICAS Y VIROLOGICAS EN LA VIGILANCIA ACTIVA DE LA FIEBRE AFTOSA

## INTRODUCCIÓN

**L**os avances observados en la lucha contra la fiebre aftosa en el Continente Americano y en especial en Sudamérica, pusieron en relieve los instrumentos de diagnóstico, y de diseño estadístico-epidemiológicos empleados en la vigilancia de la enfermedad. El Plan Hemisférico de Erradicación de la Fiebre Aftosa –PHEFA, cumple su 16°. aniversario y lo conmemora con un 55% del área productiva de Sudamérica libre de la fiebre aftosa, con o sin vacunación y con perspectivas seguras de inclusión de otras zonas en un futuro próximo. Este propósito solo ha sido posible a partir de la implementación de los criterios de regionalización, base de los programas, que llevaron a la incorporación continua de nuevas zonas libres. En apoyo a estos programas y con el propósito de dar mayor confiabilidad tanto a los actores directamente involucrados en la lucha, como a aquellos que comercian con países aún endémicos, es que se desarrollaron herramientas seroepidemiológicas y de caracterización viral capaces de establecer la ausencia de actividad viral y de rastrear el posible origen de un episodio, actividades cada vez más requeridas por los organismos de apoyo técnico y de reconocimiento internacional.

Este seminario incluye dos aspectos básicos de los desarrollos alcanzados: En primer lugar se abordan los instrumentos de diagnóstico para la vigilancia de la fiebre aftosa, tanto para la búsqueda de anticuerpos resultantes de la infección por el VFA como para la identificación y caracterización del agente mismo. El segundo modulo describe los instrumentos de diseño estadístico-epidemiológicos en la vigilancia de fiebre aftosa. Finalmente, Argentina, Brasil, Chile, Colombia y Uruguay presentan sus experiencias en el uso de dichas pruebas en los procesos de liberación de zonas/países, o en el mantenimiento del estatus de libre con base en actividades de vigilancia activa.

Los trabajos que se incluyen en el documento, presentados durante el Seminario fueron ampliamente discutidos y permitieron definir las Conclusiones y Recomendaciones que se presentan en el capítulo final de este informe.

**DR. EDUARDO CORREA MELO**

*Director de PANAFTOSA*

## **Módulo 1**

### **INSTRUMENTOS DE DIAGNÓSTICO PARA LA VIGILANCIA DE FIEBRE AFTOSA**



# Instrumentos diagnósticos para la vigilancia de la fiebre aftosa

*Ingrid E. Bergmann*

Panaftosa - OPS/OMS

## RESUMEN

Los resultados e investigaciones de laboratorio son componentes fundamentales para los programas de control y erradicación de la fiebre aftosa. A partir de 1988, cuando se implementa el Plan Hemisférico de Erradicación de Fiebre Aftosa (PHEFA) en América del Sur, un gran desafío para PANAFTOSA como laboratorio de referencia de OIE para la región en diagnóstico de fiebre aftosa y estomatitis vesicular y en control de vacuna antiaftosa se relacionó a la adecuación de los enfoques de diagnóstico a las nuevas exigencias de la transición epidemiológica prevista para el Continente. En este contexto, el diagnóstico debió incluir además de los instrumentos oportunamente desarrollados, implementados y transferidos por PANAFTOSA a los países, relacionados a la caracterización de cepas actuantes en la región, certificación de calidad de vacuna y evaluación de cobertura inmunológica, instrumentos de mayor precisión que permitiesen un análisis epidemiológico más profundo. Este trabajo describe la adecuación del diagnóstico para responder a las nuevas exigencias impuestas por el avance del PHFA y los logros metodológicos alcanzados.

## PRINCIPALES CONSIDERACIONES PARA EL DIAGNÓSTICO

Para establecer la estrategia de diagnóstico más adecuada, es importante tener en cuenta algunas consideraciones generales que hacen al diagnóstico, relacionadas a la interacción virus-huésped, a la finalidad del diagnóstico y a otros componentes como el sistema productivo, etc.

En cuanto a los aspectos que hacen relación con la interacción virus-huésped es importante resaltar los

siguientes aspectos: a) la sintomatología clínica no permite discriminar a campo la fiebre aftosa (FA) de otras enfermedades vesiculares y confundibles tales como: estomatitis vesicular, enfermedad vesicular del cerdo, rinotraqueitis infecciosa bovina, diarrea viral bovina, mamilitis herpética bovina, lengua azul y parainfluenza tipo 3, siendo esencial la confirmación del laboratorio; b) la habilidad del virus de la FA (VFA) de inducir inclusive en animales vacunados infección subclínica que eventualmente se mantenga persistente, complica los programas principalmente en áreas de baja prevalencia, particularmente por no conocerse el papel epidemiológico de dichas infecciones. La detección de infección persistente, y su eventual transmisión silenciosa dentro del rebaño y entre los mismos, es crítica para garantizar la eliminación del virus de la población, en el marco de las exigencias del PHEFA. Esta detección se tornó aún más relevante ante la nueva visión de la Organización Internacional de Epizootia (OIE) para el reconocimiento de país libre, basada no únicamente en ausencia de enfermedad sino también de infección; c) la variabilidad del VFA exige que el diagnóstico evalúe si las cepas de la vacuna protegen a la cepa actuante en el campo en ese momento. Por otro lado, la variabilidad puede ser explotada para establecer el posible origen de un foco a partir del seguimiento genético de los virus, estudio particularmente relevante en regiones de baja prevalencia para dar apoyo a la definición de las medidas de control.

Con relación a la finalidad del diagnóstico, esta puede ser considerablemente diversa e incluir: la atención a un episodio, sea con o sin expresión clínica, que busca principalmente el aislamiento y caracterización primaria del agente involucrado; la vigilancia seguida a un episodio que comprende la investigación más detallada de la caracterización del agente causal y el rastreo de



nichos en áreas que tuvieron relación con la región del episodio; y la vigilancia activa en áreas que ya prácticamente no manifiestan presencia clínica de la enfermedad y que incluye entre sus actividades muestreos orientados a la búsqueda de potencial infección (clínica y persistente).

Por último, la selección de la estrategia de diagnóstico también debe contemplar las características de la población en la que se aplicará, por ejemplo si es o no vacunada, su tamaño, la prevalencia de la enfermedad, etc.

## **ENFOQUES DE DIAGNÓSTICO ANTE EL PHEFA**

La disponibilidad de información de laboratorio precisa y oportuna y basada en metodología validada según criterios internacionales es un componente fundamental para mantener un programa de control y erradicación de FA de calidad reconocida. Durante la última década la transición epidemiológica resultante del éxito del PHEFA, así como la existencia de nuevos escenarios económicos como la globalización del comercio, los avances de las comunicaciones, y los progresos científico y tecnológicos, han impuesto nuevas exigencias para garantizar el reconocimiento de la calidad de los servicios de diagnóstico y de control de vacuna.

En este sentido las prioridades de PANAFTOSA como laboratorio de referencia de la región estuvieron asociadas a las cambiantes demandas técnico-científicas, metodológicas y de formación de recursos humanos de los países, adecuando sus funciones a los diferentes requerimientos según el progreso de los programas de erradicación y las consideraciones mencionadas en el punto anterior.

Así, durante las etapas iniciales del PHEFA el énfasis del diagnóstico se orientó a asegurar el control de calidad de las vacunas, a evaluar la cobertura inmunológica para definir la vacuna y el esquema de vacunación más apropiado, y a fortalecer el diagnóstico convencional de atención. A medida que la prevalencia fue disminuyendo, el diagnóstico de atención requirió ser particularmente sensible e incluir métodos rápidos y precisos para confirmación del agente, incluyendo el diagnóstico diferencial. Además fue necesario incorporar enfoques para el seguimiento e investigación

del episodio con el objeto de apoyar las medidas de control y prevención, así como de brindar confiabilidad al Programa, y se tornó fundamental desarrollar enfoques diagnósticos para la vigilancia activa, incluyendo la evaluación de potencial presencia de virus persistente en la población. Esta vigilancia permite establecer posibles fuentes de riesgo de introducción / reingreso y de difusión de FA y garantizar la eliminación del VFA de la población, particularmente relevante previo a la retirada de la vacunación. Para esta vigilancia activa eran necesarios métodos altamente sensibles y específicos. Igualmente, en áreas de baja prevalencia era importante incorporar criterios de bioseguridad tanto edilicia como de los procedimientos, como por ejemplo el reemplazo de la prueba de descarga para el control de vacuna, que utiliza virus infectivo, por pruebas indirectas inocuas.

A seguir se resumen los instrumentos laboratoriales requeridos para atender a la transición epidemiológica resultante del progreso del PHEFA, que como fuera descrito focalizan: A) a tres finalidades diagnósticas: la atención al episodio, el seguimiento e investigación del episodio y la vigilancia activa; B) a la adecuación de métodos inocuos para el control de potencia de vacuna; C) a aspectos relacionados a calidad de los servicios.

### **A.1. DIAGNÓSTICO EN LA ATENCIÓN ANTE EPISODIO**

Ante la presencia de una sospecha de FA se deben coleccionar muestras adecuadas de varios animales afectados por la enfermedad para el diagnóstico confirmatorio, incluyendo el diagnóstico diferencial. Las muestras preferentemente deben ser de fragmentos de epitelio y líquidos vesiculares provenientes de lesiones linguales, bucales, podales o de ubre, en los cuales se puede detectar el virus con relativa facilidad siempre que sean frescos y conservados de acuerdo con las indicaciones. En los animales que tuvieron la enfermedad y en los que no fue posible conseguir epitelio de las lesiones se podrá coleccionar fluidos esofágicos faríngeos. Suspensiones homogeneizadas y clarificadas de las muestras son inoculadas en sustratos celulares sensibles para aislar el virus. Si se desarrolla efecto citopático en las células el fluido es usado en las pruebas diagnósticas de identificación.

Tres pasajes a ciegas son realizados en cultivos negativos. Complementariamente, muestras pareadas de sueros también pueden ser colectadas, preferentemente de 10 animales, incluyendo animales de varias especies susceptibles con y sin sintomatología clínica para establecer un aumento de título de anticuerpos específicos. Como parte de este Seminario se ha distribuido una versión actualizada del Manual de Procedimiento para colecta y envío de muestras de campo para el diagnóstico de enfermedades vesiculares y su diagnóstico diferencial (PANAFTOSA, 2003).

La detección / caracterización del antígeno de FA se realiza convencionalmente mediante fijación de complemento con sueros policlonales, que permiten su tipificación y subtipificación, y/o mediante ELISA-SI para la tipificación con sueros policlonales. El establecimiento de las relaciones serológicas mediante fijación de complemento determina el valor r y orienta sobre la homología de la cepa actuante con la cepa vacunal y la protección que esta última proporcionaría. La decisión final de dicha cobertura se obtiene a partir del estudio del nivel de protección determinado por expectativas porcentuales de protección (EPP) obtenidas a partir del estudio de las cepas de campo frente al panel de sueros de bovinos vacunados y revacunados con la cepa vacunal mediante ELISA-CFL (competición fase líquida) o seroneutralización. Cuando las EPP superan 70% (30 bovinos) frente al panel de sueros de bovinos revacunados, se considera que el nivel de protección de la cepa vacunal frente a la de campo, es satisfactorio.

En regiones con programas de erradicación avanzados, el sistema de detección ante una evidencia de infección, sea con o sin expresión clínica, debe ser particularmente sensible e involucrar metodologías más rápidas y precisas para confirmar la presencia del agente viral y evaluar posibles cambios fenotípicos que comprometan la protección por las vacunas. La optimización de nuevos instrumentos para el diagnóstico de atención ante emergencias, incluyendo el diagnóstico diferencial, ha jugado un papel relevante. El desarrollo de métodos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detección y tipificación del VFA y para su diferenciación de otras enfermedades vesiculares y confundibles está siendo tratado con prioridad. El PCR

consiste en una amplificación de regiones específicas del genoma viral, siendo posible amplificar en aproximadamente 2,5 horas el genoma viral seleccionado en  $10^9$  veces. La región a amplificar es definida por un par de iniciadores con secuencias complementarias a la región genómica que flanquea la región a amplificar. En los casos en que se sospecha infección subclínica o, cuando las muestras son colectadas antes del apareamiento de los síntomas clínicos de la enfermedad este método es particularmente relevante, ya que permite la rápida evaluación de la extensión del episodio. En algunos casos puede haber componentes inhibitorios de la reacción de PCR por lo que no todas las muestras que contengan virus dan positivas. Asimismo el problema de inespecificidades de este enfoque ha sido demostrado. Alternativamente, métodos bioquímicos y pen-side tests están siendo evaluados en varios laboratorios del mundo como complementarios al PCR. La validación del desempeño del PCR y de pen-side tests para diagnóstico de emergencia, incluyendo el diagnóstico diferencial, y del alcance y limitaciones de estos métodos es de fundamental importancia.

Igualmente, y teniendo en cuenta la importancia del diagnóstico diferencial para aclarar aquellos casos con un diagnóstico negativo a FA es esencial estimular la evaluación de los procedimientos disponibles. La armonización de las estrategias a ser utilizadas en la región ha sido extensamente discutida durante el Seminario Internacional que tuvo lugar en PANAFTOSA en Octubre, 2002, a partir del cual ha surgido una nueva propuesta para la toma de muestras de forma a reforzar este diagnóstico. Recientemente se actualizó el Manual de Procedimiento para colecta y envío de muestras de campo para el diagnóstico de enfermedades vesiculares y su diagnóstico diferencial (PANAFTOSA, 2003), documento distribuido durante este seminario.

Los nuevos enfoques particularmente requeridos para áreas de baja prevalencia, también comprenden instrumentos diagnósticos para la caracterización genética y antigénica del VFA. Se ha conseguido un importante progreso en el establecimiento de los bancos genéticos de los virus de relevancia epidemiológica de la región, lo que permite la construcción de árboles filogenéticos y así el seguimiento de virus a campo y la

confirmación de la hipótesis de origen, de gran relevancia para la toma de decisiones para la prevención y el control de la enfermedad. La metodología para establecer la secuencia nucleotídica es relativamente simple y está prácticamente automatizada. Sin embargo, la interpretación de resultados es compleja y requiere estudios comparativos, para lo cual un compromiso regional para ampliar el banco de datos genético de las cepas de nuestra región es fundamental para el correcto análisis de resultados, que debe incluir criterios no solo cuantitativos sino también cualitativos. Independientemente del tipo de diagnóstico que tenga el laboratorio nacional, muestras deben ser rápidamente encaminadas a PANAFTOSA para la caracterización molecular. Esto puede permitir el seguimiento del origen del foco y afectar las medidas de control. En este contexto, es importante mencionar que PANAFTOSA depende del envío regular de muestras para actualizar su banco de secuencias nucleotídicas, esencial para el mapeo y seguimiento de los focos. El procedimiento para el procesamiento de la muestra para su envío en forma ya inactivada se encuentra detallado en el Manual de Procedimiento para colecta y envío de muestras de campo para el diagnóstico de enfermedades vesiculares y su diagnóstico diferencial (PANAFTOSA, 2003).

El desarrollo de metodología para producción de hibridomas y la definición de paneles de anticuerpos monoclonales también ha contribuido a una caracterización antigénica precisa del VFA, importante tanto para el control de las cepas utilizadas en el control y la producción de vacuna, como para las actantes en el campo. Asimismo, anticuerpos monoclonales han sido producidos y caracterizados para uso en el diagnóstico de enfermedades confundibles con FA.

## **A.2. DIAGNÓSTICO PARA EL SEGUIMIENTO E INVESTIGACIÓN DEL EPISODIO**

Los estudios de caracterización genética son de gran valor para el seguimiento e investigación de un episodio. La investigación de las relaciones genéticas mediante secuenciamiento identifica relaciones entre cepas colectadas de diferentes regiones y a lo largo de considerables períodos de tiempo. Basado en estas relaciones se construye un dendograma que permite establecer las relaciones filogenéticas y así inferir el

posible origen del episodio. Lógicamente este estudio implica un compromiso regional para evitar la presencia de eslabones perdidos en el análisis lo que limitaría considerablemente la interpretación. Cabe mencionar que la confirmación de la hipótesis de origen es un aporte importante para dar confiabilidad al programa.

Por otro lado la investigación del episodio debe involucrar un programa de vigilancia activa en las áreas relacionadas (ingreso y egreso). Los enfoques serán detallados a continuación.

## **A.3. DIAGNÓSTICO PARA VIGILANCIA ACTIVA**

Para el PHEFA, en el contexto regional e internacional, la búsqueda en una región que ya no manifiesta sintomatología clínica de posible infección persistente remanente, y la potencial circulación silenciosa del agente dentro y entre rebaños se torna de igual relevancia que la detección de infección clínica. Esta búsqueda es relevante para el monitoreo de actividad viral remanente, para el monitoreo en apoyo a la declaración de región libre de infección, según la nueva visión de OIE que establece como requisito para declaración de región libre la confirmación de ausencia de infección además de ausencia de enfermedad, y como apoyo al análisis de riesgo.

El monitoreo de infección persistente durante la vigilancia activa solo puede ser alcanzado a partir de metodologías dirigidas a un estudio poblacional y donde se utilicen técnicas altamente sensibles y específicas, aptas para evaluar poblaciones, independientemente de su estado de vacunación. En este contexto, el reemplazo de la prueba IDGA-VIAA y/o ELISA-VIAA por pruebas inmunoenzimáticas basadas en la detección de anticuerpos contra las proteínas no capsidales recombinantes 3A, 3B, 2C, 3D y 3ABC, purificadas a homogeneidad, han mostrado ser de gran valor para la evaluación de circulación viral en la población, independientemente de la vacunación. Las consideraciones metodológicas y de interpretación de estas pruebas para la vigilancia activa serán tratadas extensamente en otro trabajo de este documento.

Cabe mencionar que los métodos de detección viral como PCR aún no están validados para uso en vigilancia activa.

## **B. AVANCE EN EL USO DE PRUEBAS INOCUAS PARA EL CONTROL DE POTENCIA DE VACUNA.**

Otro importante aporte en respuesta a las exigencias impuestas por el progreso del PHEFA ha sido la aplicación de pruebas indirectas de ELISA para control de calidad de vacuna. A partir del Seminario Internacional de Control de Vacuna que tuvo lugar en PANAFTOSA en Septiembre, 2001, se armonizaron los niveles de exigencia de potencia en la región y se desarrollaron las estrategias para la acreditación de sistemas de control de calidad de las vacunas.

## **C. CONTROL DE CALIDAD Y ACREDITACIÓN DE LABORATORIOS**

Dentro de un marco que de confiabilidad a las actividades del PHEFA, los servicios diagnósticos deben contar con un sistema de garantía de servicios que respalde la rastreabilidad de los procedimientos, su control de calidad y su reconocimiento internacional con desempeños armonizados. Para adecuarse a los mismos PANAFTOSA viene reforzando los sistemas de control de gestión y de definición de normas para garantía de calidad diagnóstica, a través del fortalecimiento de los enfoques de control de calidad interno y externo y de la implementación de un sistema de acreditación de laboratorios de la Región. Este enfoque se ha consolidado a partir de la VIII Recomendación de la III Reunión Extraordinaria de la COSALFA, de implementar un sistema de auditorías externas, coordinadas por PANAFTOSA, como instrumento para evaluar el proceso de garantía de calidad de los Servicios Veterinarios en el Cono Sur, decisión ratificada en el VII Resolución de la XXVIII COSALFA y en la XII RIMSA.

## **CONSIDERACIONES FINALES**

Resumiendo, los instrumentos de diagnóstico en apoyo al PHEFA comprenden la confirmación y caracterización rápida y precisa del agente causal de la sospecha de FA, sea expresada clínicamente o no, y monitoreos serológicos para evaluar potencial actividad viral persistente. Este último es de importancia una vez que no se conoce el papel epidemiológico de las infecciones persistentes, su potencial transmisión intra

e inter rebaños y la eventual inducción de un foco clínico que pueda colocar en riesgo el programa. Evidentemente este es un tema cuya mayor comprensión requiere de un sistema con un proceso interpretativo de considerable complejidad, la que contrasta con la simplicidad propia de la ejecución de las pruebas y de su lectura.

Como en todo sistema, la calidad de la información resultante está directamente relacionada a la calidad de la información de entrada y a la propia calidad del proceso en sí que abarca aspectos relacionados al conocimiento sobre obtención de muestras para procesamiento adecuadas para el objetivo del estudio, manejo, almacenamiento, conocimiento de los fundamentos de los métodos de laboratorio, alcances y limitaciones de los tests, procesamiento de los datos, criterios interpretativos y elaboración del informe final. Cada paso es relevante para garantizar la precisión del resultado y cada paso se debe coordinar con el anterior. Obviamente solo a partir de este trabajo de equipo se garantiza la calidad del resultado y la correcta interpretación, particularmente en el marco de la complejidad del sistema diagnóstico en cuestión.

## **CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS**

En resumen podemos destacar que PANAFTOSA, conjuntamente con la red de laboratorios de los servicios nacionales de la región se depara constantemente con nuevos desafíos a medida que avanzan los programas de erradicación, las metodologías de diagnóstico y las demandas internacionales. En este sentido los esfuerzos deben continuar y son varias las áreas que se tendrán que abordar a corto plazo. Estas incluyen: Fortalecer los programas de certificación de garantía de calidad; Optimizar las estructuras de comunicación; Reforzar los desarrollos y validación de herramientas para diagnóstico de emergencia: Validar los métodos de PCR y pen-side tests, así como actualizar los paneles de anticuerpos monoclonales como indicadores de la capacidad de las vacunas disponibles de neutralizar a la cepa actuante en el campo; Implementar la rutina del diagnóstico diferencial bajo pautas armonizadas de desempeño; Fortalecer el diagnóstico para vigilancia activa en especies diferentes que bovino (este punto será tratado extensivamente en otra presentación de este

documento); Continuar las investigaciones sobre el papel epidemiológico de los animales persistentemente infectados. La preocupación sobre el papel epidemiológico de los animales portadores se ve reforzada frente a las propuestas de ajuste del Código Zoosanitario Internacional, en lo relativo a los plazos para recuperar la condición de país libre o zona libre de fiebre aftosa con o sin vacunación. En este sentido entre la documentación del seminario, ha sido entregada para evaluación de los países una propuesta de proyecto, como guía de los modelos que requieren ser estudiados.

## REFERENCIAS

- Alonso A, Penha MDG, Ramalho AK, Allende R, Barahona H, Sondahl M, Osorio F. Characterization of foot-and-mouth disease virus by monoclonal antibodies. *Viral Immunol* 1993; 6(3):219-228.
- Alonso A, Darsie GC, Teixeira AC, Reis JL, Mesquita JA. Application of monoclonal antibodies to quality control of foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine* 1994;12(8):682-686.
- Bergmann IE, Malirat V, Pereira PJV. Molecular characterization of foot-and-mouth disease virus strains used for vaccine production in South America. *Bol Cent Panamerican Fiebre Aftosa* 1992;(58):119-127.
- Bergmann IE, Augé de Mello P, Neitzert E, Beck E, Gomes I. Diagnosis of persistent aphthovirus infection and its differentiation from vaccination response in cattle by use of enzyme-linked immunoelectrotransfer blot analysis with bioengineered nonstructural viral antigens. *Am J Vet Res* 1993; 54: 825-831.
- Bergmann IE, Malirat V. Molecular approaches to laboratory diagnosis of persistent foot-and-mouth disease virus infection: A review. *Bol Cent Panamerican Fiebre Aftosa* 1993;(59):166-177.
- Bergmann IE, Malirat V. Performance of a rapid enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay for detection of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus. *Bol Cent Panamerican Fiebre Aftosa* 1995;(61):40-44.
- Bergmann IE, Malirat V, Dias LE, Dilandro R. Identification of foot-and-mouth disease virus-free regions by use of a standardized enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay. *Am J Vet Res* 1996;57:972-974.
- Bergmann IE, Astudillo V, Malirat V, Neitzert E. Serodiagnostic strategy for estimation of foot-and-mouth disease viral activity through highly sensitive immunoassays using bioengineered nonstructural proteins. *Vet Q* 1998;20:S6-S9.
- Bergmann IE, Malirat V, Neitzert E, Beck E, Panizzutti N, Sánchez C, Falczuk A. Improvement of a serodiagnostic strategy for foot-and-mouth disease virus surveillance in cattle under systematic vaccination: a combined system of an indirect ELISA 3ABC with an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay. *Arch Virol* 2000; 145:473 - 489.
- Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. Resoluciones y recomendaciones de la Comisión Sudamericana para la Lucha contra la Fiebre Aftosa 1973-1981. Rio de Janeiro: PANAFTOSA; 1982. (Serie de Monografías Científicas y Técnicas 9).
- Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. Informe final: VII Seminario Internacional de Control de Vacuna Antiaftosa. Rio de Janeiro: PANAFTOSA; 2001.
- Doel TR, Kanashiro MM, Silva JL. Detailed characterization of some monoclonal antibodies which recognize antigenic sites on VP1 of foot-and-mouth disease virus. *Bol Cent Panamerican Fiebre Aftosa* 1993; (59): 102-110.
- Kanashiro MM, Contreiras EC, Alonso A, Barahona H. Production of monoclonal antibodies against group specific bluetongue virus antigens. *Bol Cent Panamerican Fiebre Aftosa* 1992; (58): 50-54.
- Malirat V, Bergmann IE, Augé de Mello P, Tiraboschi B, Beck E, Gomes I. Genetic variation of foot-and-mouth disease virus during persistent infection in cattle. *Virus Res* 1994; 34 (1):31 - 48.
- Malirat V, Neitzert E, Bergmann IE, Maradei E, Beck E. Detection of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus by means of an indirect ELISA test using bioengineered nonstructural polyprotein 3ABC. *Vet Q* 1998; 20: S24 - S26.
- Malirat V, Bergmann I. Fiebre aftosa. Instrumentos moleculares para caracterización viral: manual RT-PCR y secuenciamiento cíclico para estudios de epidemiología molecular del virus de la fiebre aftosa. Rio de Janeiro: PANAFTOSA; 2002. (Serie de Manuales Didácticos 17).
- Neitzert E, Beck E, Augé de Mello P, Gomes I, Bergmann IE. Expression of the Aphthovirus RNA polymerase gene in *Escherichia coli* and its use together with other bioengineered nonstructural antigens in detection of late persistent infection. *Virology* 1991; 184:799 - 804.
- Silva JL, Kanashiro MM, Brum DL. Production and characterization of monoclonal antibodies against foot-and-mouth disease virus. *Bol Cent Panamerican Fiebre Aftosa* 1993; (59):85 - 92.
- Winkler MTC, Osorio FA, Sondahl MS, Rangel Filho FB, Barahona H. Anticuerpos monoclonales específicos para herpes virus Bovino tipo 1 (cepa Cooper). *Bol Cent Panamerican Fiebre Aftosa* 1992; (58): 25 - 34.

# Pruebas serológicas y virológicas para la vigilancia activa de la fiebre aftosa

*Ingrid E. Bergmann, Viviana Malirat, Erika Neitzert*

PANAFTOSA - OPS/OMS

## INTRODUCCIÓN

A partir de 1988, cuando se implementa el Plan Hemisférico de Erradicación de la Fiebre Aftosa (PHEFA), el avance de los programas en Sudamérica acentuó la necesidad de contar con instrumentos diagnósticos capaces de detectar inequívocamente la actividad viral persistente en poblaciones de animales, sometidos o no a vacunación. Esta evaluación era esencial para establecer el progreso del Plan y cobraba particular relevancia ante la falta de conocimiento sobre el papel epidemiológico de los animales persistentemente infectados, la potencial transmisión de la infección intra e inter rebaños, y eventualmente la capacidad de generar un foco clínico, conceptos fundamentales para un programa de control y erradicación de la fiebre aftosa.

Asimismo, la evaluación de infección persistente se tornó particularmente relevante a partir de la nueva visión de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) en lo que se refiere al reconocimiento de una región libre de fiebre aftosa (FA), ya que no se basa solamente en la ausencia de enfermedad sino también de infección.

En respuesta a las nuevas exigencias del PHEFA, en 1988, fue iniciada en el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (PANAFTOSA) OPS/OMS la investigación de abordajes diagnósticos para evaluar actividad viral persistente del virus de la FA (VFA) en poblaciones animales, independientemente de la condición de vacunación.

El presente trabajo resume la experiencia de PANAFTOSA en lo que se refiere a la evaluación, desarrollo, validación y aplicación de métodos y enfoques diagnósticos para uso en la vigilancia activa del VFA, con particular énfasis en la descripción del sistema integrado por un ensayo inmunoenzimático indirecto (I-ELISA 3ABC) para uso como prueba

“screening”, y un ensayo inmunoenzimático de electrotransferencia (EITB) como confirmatorio de muestras evaluadas como sospechosas mediante I-ELISA 3ABC. También serán discutidos los criterios para interpretación de resultados, así como una forma más eficiente de análisis de los datos.

## CONSIDERACIONES SOBRE MÉTODOS BASADOS EN DETECCIÓN VIRAL

Evidentemente las pruebas basadas en la detección directa del agente serían ideales para el diagnóstico de infección persistente. Sin embargo y en función de factores tales como vacunación, inmunidad, dosis infectiva, huésped y virulencia de la cepa involucrada, puede suceder que durante la infección persistente el título viral sea considerablemente bajo, lo que podría comprometer la sensibilidad de detección cuando se usa el método convencional de aislamiento viral en cultivo celular a partir de material de fluido esofágico faríngeo (OP).

Asimismo, es interesante mencionar que resultados obtenidos a partir de modelos experimentales de animales persistentemente infectados para los cuales fueron colectadas muestras mensualmente durante dos años, evidenciaron que la recuperación viral era ocasional, particularmente en etapas tardías de la infección, sugiriendo que el resultado negativo podría representar restricciones metodológicas. Tales resultados demostraron que la sensibilidad de la prueba, dependiendo de las circunstancias y de la etapa del estado persistente, podía caer a valores inferiores al 50%, lo que torna la prueba inadecuada para la detección inequívoca de animales con infección persistente.

Las técnicas de genética molecular han permitido el desarrollo de instrumentos poderosos para definir nuevos procedimientos para la detección del agente.

En otra presentación de este seminario se ha descrito el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para uso durante atención a un episodio. Con relación a la detección de infección persistente durante la vigilancia activa, los resultados obtenidos hasta el presente indican que el PCR no consigue superar las posibles restricciones metodológicas mencionadas. En parte, esto podría estar asociado a la toma inapropiada de muestras, una vez que no se tiene un conocimiento preciso de los locales de persistencia. De hecho, investigaciones llevadas a cabo en PANAFTOSA identificaron secuencias de virus en varios órganos, inclusive cuando era negativo el resultado de aislamiento viral y PCR en OP. Evidentemente este conocimiento constituye un prerrequisito esencial para la adecuada toma de muestra destinada a la detección directa del agente.

Además de las posibles restricciones metodológicas mencionadas, las pruebas de detección viral, basadas en aislamiento viral y PCR, tienen limitaciones relacionadas a aspectos inherentes a los métodos en sí, a que no son prácticas ni económicas para uso en grandes muestreos y a que requieren considerable infraestructura de laboratorio.

Es importante resaltar que es necesario continuar los trabajos para definir hasta que punto el PCR podría ser utilizado para evaluar infección persistente, principalmente como test confirmatorio de una serología positiva. La disponibilidad de métodos automatizados de PCR permitiría una considerable simplificación al procesamiento.

## **CONSIDERACIONES SOBRE MÉTODOS BASADOS EN DETECCIÓN DE ANTICUERPOS**

Debido a las restricciones de las pruebas directas de detección viral, los esfuerzos fueron orientados hacia la validación de métodos basados en la detección de anticuerpos. Éstos presentan la ventaja de ser más adecuados para levantamientos epidemiológicos de gran escala, como los proyectados para la región de Sudamérica, una vez que son más rápidos, prácticos, económicos, fáciles de ejecutar (permitiendo entrenamientos rápidos) e inocuos.

Dado que el mayor desafío era el de detectar infección persistente y su supuesta transmisión a hospedadores susceptibles, el abordaje metodológico debía ser: a) altamente sensible para detectar sueros de bajo título, comunes durante la infección subclínica, especialmente en etapas avanzadas de la persistencia, sin importar la condición de vacunación; b) altamente específico para evitar la distorsión del valor predictivo en regiones de baja prevalencia, en las que fundamentalmente iría a ser usado; c) manejado sobre un enfoque poblacional para permitir evaluar la transmisión silenciosa.

Una importante consideración para la validación de un abordaje indirecto para evaluar infección, como es la detección de anticuerpos, fue la inexistencia de una prueba patrón oro, directa o indirecta, para detección confiable de animales persistentemente infectados. Esto era particularmente crítico si se tiene en cuenta que los métodos indirectos no distinguen entre anticuerpos inducidos por infección presente, persistente o pasada.

Era foco central durante la validación la evaluación de persistencia al nivel de rebaños, lo que significaba la posibilidad de presencia de varios portadores o aún más importante la transmisión silenciosa del VFA por parte de animales infectados a otros animales del mismo o de otros rebaños. En este sentido, tuvo que ser contemplado tanto un diseño adecuado del muestreo como la interpretación apropiada de los resultados. Por otro lado, el abordaje precisaba ser dirigido al desarrollo de un instrumento único capaz de armonizar los diferentes requisitos de precisión impuestos por cada situación diagnóstica en la cual iría a ser usado (situaciones epidemiológicas heterogéneas, coberturas inmunológicas variadas, etc.).

Por último, el hecho que el sistema iría a ser aplicado en regiones con alta cobertura inmunológica impedía el uso de los métodos existentes, que detectan anticuerpos contra proteínas capsidales.

## **ESTRATEGIA**

La estrategia diagnóstica implementada fue dirigida a la detección de anticuerpos contra proteínas no capsidales (PNC) del virus que integran el complejo de replicación que, en principio, sólo son inducidas durante la infección y no como resultado de la

inmunización con vacunas convencionales inactivadas con BEI. Las PNC tenían la ventaja adicional de ser altamente conservadas para todos los serotipos, de tal forma que cualquier serotipo podrá ser identificado en una única prueba.

Debe tenerse en cuenta, además de las razones mencionadas, que el abordaje seleccionado representaba el primer estudio sobre el uso de PNC. No se disponía de información sobre la respuesta de anticuerpos en animales infectados, como tampoco a respecto de la presencia de PNC en vacunas y la consecuente inducción de anticuerpos en animales inmunizados.

En este contexto los primeros esfuerzos fueron orientados a evaluar simultáneamente y discriminar en forma individual las potenciales diferencias del perfil de la respuesta de anticuerpos contra cinco PNC recombinantes, que podían ser inducidas bajo varias condiciones experimentales y/o de campo. Con base en los resultados obtenidos fue identificado el antígeno más adecuado para una prueba única de I-ELISA: 3ABC o 3AB. Este I-ELISA fue diseñado originalmente para reducir el riesgo de perder un suero positivo, reforzando la especificidad a través de una prueba confirmatoria. Consecuentemente, fue validado un sistema compuesto por una prueba “screening”, el I-ELISA 3ABC, de alta sensibilidad, seguido por confirmación de muestras reactivas o sospechosas por el método EITB de alta especificidad que usa cinco antígenos no capsidales recombinantes como sondas serológicas 3A, 3B, 2C, 3D y 3ABC.

Para alcanzar los más altos valores posibles de sensibilidad, especificidad y reproductibilidad, los antígenos recombinantes fueron purificados a homogeneidad por electroelución a partir de geles para los antígenos 3A, 3B, 2C y 3ABC, y por columna de afinidad para el antígeno 3D. No fue considerada la alternativa del uso de un I-ELISA para cada uno de los cinco antígenos debido a las limitaciones que eso traería para el uso en grandes muestreos.

## **PROCESO DE VALIDACIÓN**

Las diferentes etapas seguidas a lo largo del proceso de validación están descritas en el CD “Herramientas seroepidemiológicas (I-ELISA 3ABC / EITB) en la

vigilancia activa de la fiebre aftosa”, PANAFTOSA OPS/OMS, 2003, distribuido durante el presente seminario. Sigue un resumen de dicho proceso.

## **CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO**

Todas las etapas comprendidas en la definición de las características de desempeño como en la validación a campo fueron sustentadas por la disponibilidad de un gran espectro de relevantes modelos experimentales y de campo. Estos habían sido diseñados con base en la gran experiencia de PANAFTOSA en lo que se refiere a la infección persistente del VFA como también a la estrecha colaboración con los Laboratorios de los Servicios Nacionales de la región. Entre otros, los modelos estudiados incluyeron: seguimiento de animales persistentemente infectados en forma experimental y a campo durante 1 ó 2 años, con y sin vacunación; animales inmunizados y reinmunizados con vacunas de diversas fuentes y en diferentes condiciones; muestreos extensivos de campo representando diferentes situaciones epidemiológicas; y seguimiento de focos en función del tiempo con y sin vacunación.

Podemos resumir que en las condiciones analizadas contamos con características de desempeño de sensibilidad y especificidad excelentes para detección de infección persistente. El valor de sensibilidad del I-ELISA 3ABC / EITB obtenido con muestras pareadas de OP y sueros en varios bovinos vacunados o no, expuestos al VFA en condiciones controladas indicó que la sensibilidad del I-ELISA 3ABC / EITB relativa a muestras OP positivas (aquellas en que se aisló virus) es de 100% (n=428). En cambio, la sensibilidad de OP relativa a I-ELISA 3ABC / EITB positivos en estos animales (n=861) es solo de 46.9%. La especificidad resultó de por lo menos 99.2% para el I-ELISA 3ABC y de 100% para EITB en áreas sin vacunación.

Entre las variables que podían afectar la aplicación del sistema era prioritaria la evaluación de la potencial interferencia de vacuna. Las vacunas producidas de partículas del VFA parcialmente purificadas y totalmente inactivadas pueden contener cantidades variables de algunas o de todas las PNC las cuales bajo condiciones apropiadas de presentación podrían inducir una respuesta de anticuerpos en animales inmunizados. Como no se disponía de información a



respecto de la presencia de PNC en las preparaciones de vacunas y como la potencial inducción de anticuerpos en animales vacunados no se conocía, nos concentramos en el análisis de potencial interferencia de vacuna tanto bajo condiciones controladas como a campo.

El sistema probó ser efectivo para confirmar ausencia de actividad viral en la población animal independientemente de la condición de vacunación. Fue demostrada ausencia de interferencia en alrededor de 10.000 sueros de animales vacunados, aún cuando sometidos a condiciones de vacunación no convencional que llevaran a un aumento de la respuesta inmune (vacunas altamente concentradas y/o intervalos de vacunación menores a los utilizados durante la vacunación sistemática) con antígenos producidos en laboratorios de América del Sur. Por otro lado, y dado que los modelos controlados no reflejan la compleja situación de campo en la que trazas de PNC pueden inducir respuestas después de múltiples ciclos de inmunización con vacunas de diferentes productores, o también actuar como “boosters” en bovinos con bajos títulos de anticuerpos contra la replicación viral, la evaluación fue extendida a condiciones de campo. Los resultados de aproximadamente 6.600 sueros de animales vacunados de diferentes regiones sin histórico para el VFA durante por lo menos los cuatro años anteriores a la colecta de las muestras, indicaron valores de especificidad en poblaciones con vacunación sistemática de 97.9% y 95.2% para I-ELISA 3ABC, y de 99,97% y 99.7% para EITB, en animales menores y mayores de 2 años, respectivamente.

Los criterios de validación / interpretación fueron reforzados a través de la implementación, validación y aplicación en gran escala de estos métodos en la vigilancia regional en los Laboratorios de los Servicios Nacionales de casi todos los países de América del Sur. Regiones con categorías epidemiológicas definidas y en diferentes etapas del programa de erradicación fueron englobadas. La transferencia del sistema a los laboratorios requirió validar su uso a través de un panel de sueros confiable de la región correspondiente, como también certificar la ausencia de interferencia de vacunas en uso en el país. De esos laboratorios se

reunieron resultados de aproximadamente 380.000 pruebas solamente durante el año 2001.

El sistema también ha sido validado en laboratorios de referencia de la OIE a través del uso de paneles de sueros representativos. Las pruebas fueron realizadas en el Laboratorio Mundial de Referencia de FA (Pirbright, UK) y en el Laboratorio Nacional de Referencia de Italia en Brescia. Además, el sistema I-ELISA 3ABC / EITB fue incorporado al Manual de Standards de Pruebas de Diagnóstico y Vacuna de la OIE, 2000, y está siendo considerado como test de referencia para el Manual de Standards de OIE, 2004.

## **CRITERIOS DE INTERPRETACIÓN**

El proceso básico de validación indicó algunas consideraciones a ser aplicadas para la evaluación más eficiente de los resultados para uso en vigilancia:

- a. La aplicación del EITB como prueba confirmatoria es crítica ya que permite elucidar si los resultados de los sueros, particularmente de aquellos que se resuelven con valores cercanos al punto de corte del I-ELISA 3ABC, y que pueden derivar de diferentes situaciones de campo, provienen o no de animales con infección del VFA, presente, persistente o pasada. Esto se debe a la capacidad del EITB de identificar anticuerpos específicos de infección contra varias proteínas virales en un único ensayo. En este contexto, para la interpretación del EITB, el análisis del perfil de reactividad relativa entre los diferentes antígenos suministra información adicional para complementar los criterios de interpretación, ya que la respuesta de anticuerpos a la infección presenta siempre perfiles típicos de reactividad en el EITB.
- b. También se puede evaluar el riesgo de circulación de virus dentro del rebaño. En este sentido, el análisis de los resultados de acuerdo a la distribución etaria constituye un excelente indicador del riesgo de transmisión viral de animales persistentemente infectados a la población más joven. Esto es particularmente relevante cuando se está confirmando ausencia de actividad viral dentro de un rebaño, que es evidenciada por la ausencia de seroconversión de los animales jóvenes, mismo que aún haya anticuerpos presentes en la población de

animales adultos, reflejando o bien infección pasada o persistente, sin embargo no capaz de ser transmitida.

- c. Un espectro más amplio de interpretación de los resultados del I-ELISA 3ABC se obtiene cuando los resultados son analizados en términos de distribución de frecuencia de los niveles de reactividad de anticuerpos, y no solamente a través de clasificación de resultados negativos / positivos. O sea, la evaluación de cada población como un todo exhibe un perfil de reactividad de anticuerpos reflejando su potencial grado de riesgo. En este contexto, fue diseñada una presentación gráfica que incluye 6 categorías de reactividad. La misma permite inferir rápidamente el grado de riesgo epidemiológico en regiones definidas, reflejado por distintos perfiles de respuesta de anticuerpos en el I-ELISA 3ABC. Además, estos perfiles permiten un seguimiento rápido de focos en función del tiempo, como también acompañar la dispersión geográfica del episodio.

## **CONCLUSIONES Y LÍNEAS FUTURAS**

La gran flexibilidad del sistema permite una interpretación cualitativa y cuantitativa, que integrada a las informaciones epidemiológicas apoya la evaluación de riesgo en los escenarios heterogéneos de campo de América del Sur.

En resumen, el sistema puede ser usado con seguridad para la confirmación de actividad viral teniendo en cuenta algunas consideraciones tales como un diseño adecuado de muestreo, la estratificación etaria, conocimiento del último episodio en la región, sistema productivo, esquemas de vacunación, el uso de varios valores de corte en ciertas circunstancias y el uso de vacunas controladas. Bajo estas condiciones puede ser aplicado para: a) establecer persistencia al nivel de rebaño, incluyendo su potencial transmisión a

hospedadores susceptibles; b) evaluación de riesgo a través de perfiles de reactividad de I-ELISA 3ABC en substitución a una clasificación de positivos y negativos; c) seguimiento de riesgo luego de episodio a través de la distribución de los perfiles serológicos mencionados (tiempo / espacio).

Futuras líneas incluyen: a) incentivar uso en ovinos para confirmar los criterios de desempeño establecidos; complementar validación para otros hospedadores b) identificar puntos críticos durante el proceso de producción de vacuna que podrían generar interferencia de las vacunas en las pruebas. Armonizar exigencias de pureza de vacuna en la región; c) ampliar estudios del papel epidemiológico de portadores. En este contexto se ha distribuido un proyecto para definición de modelos experimentales y de campo que viabilicen los estudios necesarios; d) armonizar el uso y desempeño de pruebas serológicas para vigilancia. Esto comprende el uso de kits completos con control de calidad en PANAFTOSA; Establecer un formato único para la región del sistema diagnóstico para vigilancia activa; Apoyar a PANAFTOSA en la conformación de paneles internacionales de referencia para sustentar la definición del sistema como test de referencia de OIE; Garantizar la capacidad de los laboratorios que usan el sistema a través de auditorias de garantía de calidad interna y refuerzo del control de calidad externo; Promover un foro permanente de intercambio de resultados.

## **REFERENCIAS**

El material bibliográfico, con traducciones al español de los trabajos publicados en inglés, ha sido concentrado en el CD "Herramientas seroepidemiológicas (I-ELISA 3ABC / EITB) en la vigilancia activa de la fiebre aftosa", PANAFTOSA OPS/OMS, 2003, distribuido durante este seminario.

# Epidemiología molecular en la vigilancia

*Viviana Malirat e Ingrid Bergmann*

PANAFTOSA - OPS/OMS

## RESUMEN

El éxito de los programas de control y erradicación de la fiebre aftosa depende, entre otras medidas, de la identificación, caracterización, posible rastreo y seguimiento a campo de las fuentes de diseminación del virus, agente causal de la enfermedad. Debido al momento de transición epidemiológica que vive el continente derivado del progreso del Plan Hemisférico de Erradicación de la Fiebre Aftosa, implementado en 1988, se ha intensificado la necesidad de contar con métodos rápidos y precisos capaces de efectuar estos estudios. En este sentido, las técnicas de biología molecular permiten una caracterización más profunda de las variantes y una evaluación más precisa del grado de parentesco que la que se obtiene a partir de técnicas serológicas o inmunológicas. Estas comparaciones, analizadas conjuntamente con supuestos evolutivos conforman la base para estudios de epidemiología molecular los cuales han permitido en el caso particular del virus de la fiebre aftosa, inclusive revelar patrones de evolución viral de los diferentes serotipos así como el origen de virus responsables por brotes recientes.

Este trabajo describe los avances en los estudios de epidemiología molecular del virus de la fiebre aftosa en Sudamérica, basados en el fortalecimiento de las acciones de caracterización molecular del virus de fiebre aftosa encaradas por PANAFTOSA en los últimos años, que permitieron la construcción y sistematización del banco de datos genéticos de las cepas representativas de la región. Este banco genético, conformado por las cepas prototipo y por otras de relevancia epidemiológica para el continente, ha servido de base para el análisis filogenético de los virus responsables por las emergencias sanitarias que tomaron cuenta del Cono Sur en los últimos años, así como de los que circulan en otras regiones del continente en la actualidad. La interpretación que se

deriva del estudio de las relaciones filogenéticas y evolutivas, depende en gran medida de una conformación integral del banco de datos con la totalidad de las variantes existentes, para lo cual resulta esencial el continuo compromiso de todos los países en un proyecto regional integrado.

## ANTECEDENTES

La fiebre aftosa, enfermedad de origen viral y altamente contagiosa, ha provocado considerables pérdidas en la historia de la producción pecuaria mundial. Por este motivo, los esfuerzos para su control y erradicación han demandado la atención de los servicios veterinarios de todo el mundo. El éxito de los programas de control que se han implementado en varios países y continentes ha dependido y depende, entre otras medidas, de la identificación, caracterización, posible rastreo y seguimiento a campo de las fuentes de diseminación del virus, agente causal de la enfermedad. En este sentido, el virus de la fiebre aftosa, presenta una característica, que ha resultado muy útil para su caracterización, que es su alto polimorfismo genético y antigénico, el cual se refleja en siete serotipos y un gran número de variantes (1).

Las técnicas serológicas de tipificación y subtipificación (fijación del complemento, seroneutralización, ELISA) han sido muy útiles para este tipo de estudios. Sin embargo, a medida que un número cada vez mayor de nuevas variantes fue reconocido, se tornó necesario disponer de métodos de caracterización más precisos, que además de identificar serotipos y subtipos, permitieran una discriminación a nivel más profundo, posibilitando caracterizar diferentes variantes dentro de un mismo subtipo. Así, fueron introducidas nuevas herramientas, a partir de la aplicación de técnicas bioquímicas y de

biología molecular, capaces de establecer las relaciones genéticas entre los agentes causantes de la infección. El gran avance alcanzado en los últimos años por las técnicas de biología molecular ha permitido una evaluación mucho más precisa del grado de parentesco entre cepas virales, que actualmente alcanza niveles de comparación de estructuras genéticas primarias con contenido informativo importante para estudios evolutivos.

Para el caso particular de la fiebre aftosa, estos análisis se han focalizado principalmente en la comparación de la región que codifica para la proteína capsidal VP<sub>1</sub>, ya que esta es altamente polimórfica y juega un rol importante tanto en la inmunogenicidad como en la infecciosidad de la partícula viral debido a su papel dominante en la estructura de la superficie viral.

PANAFTOSA, consciente del papel que desempeña como centro de referencia, siempre ha estado al frente de los desarrollos tecnológicos de punta que requieren la implementación de técnicas bioquímicas y de biología molecular que permitan un análisis epidemiológico más profundo, contribuyendo así a los programas de control y prevención de enfermedades vesiculares y zoonosis. Así, desde inicios de la década de los años 80 se ha dado énfasis a los desarrollos de métodos de caracterización molecular de virus tales como *fingerprinting* del genoma total y secuenciamiento de la proteína inmunogénica VP<sub>1</sub>, que permitieron establecer con gran precisión el grado de correlación entre cepas y diferenciar variantes existentes en América del Sur. (6, 5, 4, 3, 7, 9).

Considerando el momento de transición epidemiológica que vive el continente, a partir de la implementación del Plan Hemisférico de Erradicación de Fiebre Aftosa con fecha límite para el año 2009, se ha intensificado la necesidad de contar con métodos moleculares, adecuados a la transición epidemiológica prevista y en curso en el continente, capaces de analizar en forma rápida las relaciones filogenéticas entre diferentes aislamientos. Actualmente, el secuenciamiento genómico, mediante RT/PCR y determinación automatizada de las secuencias posibilita, además de la comparación de la estructura genómica

en su nivel más íntimo, trazar una correlación de las diferencias encontradas con la relevancia de posibles cambios biológicos, pues es posible mapear exactamente la región modificada. En este sentido, PANAFTOSA ha ampliado el banco de datos de cepas prototipo y de cepas de relevancia epidemiológica en América del Sur, complementando los anteriores estudios. La información resultante del análisis retrospectivo de variantes activas en el pasado es de relevancia ya que permite inferir la dinámica de variación en circunstancias de campo, y así optimizar las interpretaciones acerca del posible origen de cepas emergentes en un futuro.

## **EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EN AMÉRICA DEL SUR**

Reemergencias en el Cono Sur, y brotes en el Area Andina

El Cono Sur de nuestro continente alcanzó su condición de libre de FA, con vacunación, declarada por la OIE, como resultado de las fuertes campañas de vacunación y vigilancia sanitaria iniciadas a partir del Plan Hemisférico de Erradicación de Fiebre Aftosa, intensificado desde 1988. La situación, en 1999, se resumía a varios países y regiones del cono sur, sin registro de fiebre aftosa y considerados libres de la enfermedad. Sin embargo, en el año 2000, brotes de fiebre aftosa registrados en la región, causados por virus tipo O, la colocaron en estado de emergencia. En 2001 una importante epidemia de FA tipo A se registró en el Cono Sur. La devastadora epidemia causada por virus tipo O que comenzó en Inglaterra en el año 2001 y se dispersó a algunos países del continente europeo, causada por un tipo de virus altamente patogénico y característico de la región sudeste asiática, aumentó la necesidad de caracterizar inequívocamente los nuevos brotes en el cono sur sudamericano. En 2002, fueron obtenidos dos aislamientos de tipo O a partir del líquido esofágico-faríngeo (LEF) de dos animales asociados a una sospecha de fiebre aftosa, en Canindeyú, Paraguay, que llevaron a modificar el estatus sanitario de ese país. Estos virus también fueron incluidos en el estudio.

Se llevó a cabo la caracterización de las cepas responsables por los brotes de tipo O: O/Jóia/RS/Bra/2000, O/Artigas/Uru/2000, O/Corrientes/Arg/2000 y O/Canindeyú/Paraguay/2002. También se abordó el análisis de la cepa A/Argentina/2000, así como de los brotes de la epidemia A-2001 en la región (20 aislamientos de Argentina, Brasil y Uruguay). Estos aislamientos fueron comparados con cepas de relevancia epidemiológica, para la región, así como con las cepas utilizadas en la formulación de las vacunas. La secuencia de nucleótidos de la región que codifica para la proteína VP1 fue determinada, utilizando el protocolo previamente descrito. (8)

El análisis filogenético de los aislamientos demostró en todos los casos, que se trataba de cepas endógenas de la región. Para el caso de los aislamientos del tipo O en el Cono Sur, en los años 2000 y 2002, se corroboró que todos ellos pertenecían al topotipo Euro-SA, y mostraban una relación genética relativamente distante con la cepa utilizada en la producción de vacunas, O1/Campos/Bra/58, con valores de divergencia promedio de 15%, a pesar de que las pruebas sugerían una buena protección con vacunas convencionales. Dentro del topotipo Euro-SA, estos aislamientos pertenecen un mismo linaje (comparten un mismo ancestral y muestran valores de homología de por lo menos 93%), del cual las únicas cepas representativas que se contaban en el banco de datos eran la cepa O/Irygoyen/Arg/83 y O/Luján/Arg/83, y con las cuales estos aislamientos muestran valores de divergencia de aproximadamente 6-8%. Otra conclusión importante del estudio fue que ninguno de los aislamientos estaba relacionado con la cepa PanAsia, causante de la epidemia en el año 2001 en Gran Bretaña y en algunos países del continente europeo.

En el caso de los aislamientos de tipo A, las variantes analizadas correspondientes a la epidemia A-2001, mostraron entre ellas una gran homología, mayor de 96% en todos los casos, y una divergencia del 11% con el aislamiento A/Argentina/2000. Cuando fueron comparadas con aislamientos del tipo A disponibles en el banco de datos genético, los virus A-2000 y A-2001, mostraron pertenecer al mismo linaje (compartiendo un ancestral común) y estar

relacionados, aunque no muy próximamente con las cepas de campo circulantes entre las décadas de 80-90 en la región, con valores de homología entre 91-94%. Las cepas A/2000 y A/2001 no son muy próximamente relacionadas a la cepa vacunal A24 Cruzeiro/Bra/55, con la cual muestran valores de divergencia de aproximadamente 14%, aunque, nuevamente, las pruebas sugerían una buena protección con vacunas convencionales.

Un análisis más exhaustivo de las cepas representativas del Continente incluyó la comparación con cepas causantes de brotes entre los años 2000-2002 en el área Andina. Para este análisis fueron estudiados un aislamiento del tipo A en Peru en el año 2000, y 16 aislamientos de una epidemia en Ecuador en el mes de Junio de 2002, 15 del tipo O, y una del tipo A. Las dos cepas analizadas del tipo A, A/Perú/2000 y A/Ecuador/2002, revelaron ser cepas endógenas del continente (Topotipo Sudamericano), pertenecientes al mismo linaje, con un valor de homología del 94% entre sí. Los aislamientos del tipo O, en Ecuador, en 2002, también mostraron ser cepas endógenas (topotipo Euro-SA). Los 15 aislamientos se diferencian en tres grupos, entre los cuales se registran valores medios de homología de 85-89%. Los aislamientos de uno de estos grupos pertenecen al mismo linaje que la cepa prototipo O1/Campos/Bra/58 (homología de aproximadamente 96%). Los otros dos grupos son bastante alejados genéticamente a cualquier otra cepa disponible en el banco de datos (menos de 88% de homología). Esta diferencia puede deberse a que no contamos con suficientes cepas representativas de los virus de la región (principalmente de los responsables por los brotes en el área andina en los últimos años), o por deberse a nuevos linajes dentro del topotipo Euro-SA. Para clarificar esta situación es necesario contar con el mayor número posible de muestras representativas de los brotes actuales en el continente.

En todos los casos (para los dos tipos, A y O) se pudo concluir que los aislamientos que circularon el Cono Sur en los años 2000-2002 no comparten los mismos ancestrales que los aislamientos estudiados del Área Andina, mostrando una diferente circulación de variantes virales en ambos circuitos pecuarios.

## PERSPECTIVAS

La aplicación de las técnicas moleculares en la caracterización precisa del agente y su posterior análisis filogenético, en estudios de epidemiología molecular se torna cada vez más presente, resultando en importantes aportes en la identificación, caracterización, posible rastreo y seguimiento a campo de las fuentes de diseminación del virus. La conformación y fortalecimiento de una base de datos regional para estos estudios, así como la sistematización de la metodología para los análisis filogenéticos y estudios de epidemiología molecular han permitido un aporte de gran valor durante las emergencias que enfrentaron los programas de erradicación en los últimos años.

En este sentido, los continuos esfuerzos de los diversos países de la región para participar en proyectos regionales integrados han sido fundamentales para la conformación de esta base de datos, la cual debe seguir siendo alimentada con la totalidad de las variantes circulantes recientemente, así como con las responsables por nuevos brotes que eventualmente puedan aparecer en el Continente para poder así conformar una base de datos cada vez más sólida, y que dé confiabilidad y mayor precisión a las interpretaciones.

Los resultados obtenidos en estudios de epidemiología molecular, complementados con análisis antigénicos mediante anticuerpos monoclonales y seroneutralización serán útiles para evaluar las bases moleculares de la antigenicidad y neutralización, y así entender el significado epidemiológico de los cambios, siendo particularmente importantes aquellos en los que se registra una alteración en la capacidad de la variante de ser neutralizada por la cepa vacunal. Adicionalmente la información generada puede ser de importancia para complementar estudios sobre diseños de vacunas de nueva generación, y sobre estructura antigénica del virus de la fiebre aftosa. El uso coordinado de información antigénica, genética y epidemiológica permite obtener un mejor sistema de evaluación de riesgo y endemismo de la fiebre aftosa posibilitando analizar la extensión de los cambios y

eventualmente evaluar la inmunogenicidad de las cepas utilizadas en la formulación de vacunas, representando una importante contribución al establecimiento de mejores estrategias para la vigilancia y el control de la fiebre aftosa.

## REFERENCIAS

1. Bachrach HL. Foot-and-mouth disease. *Annu Rev Microbiol* 1968;22:201-244.
2. Bergmann IE, Malirat V, Augé de Mello P, Gomes I. Detection of foot-and-mouth disease viral sequences in various fluids and tissues during persistence of the virus in cattle. *Am J Vet Res* 1996;57(2):134-137.
3. Malirat V, Bergmann IE, Alonso A, Pereira PJV, Boller MAA. Serological and molecular characterization of foot-and-mouth disease serotype O viruses isolated from outbreaks in Brazil and Argentina between 1958 and 1983. *Bol Cent Panamerican Fiebre Aftosa* 1993; (59): 147-152.
4. Bergmann IE, Malirat V, Pereira PJV. Molecular characterization of foot-and-mouth disease virus strains used for vaccine production in South America. *Bol Cent Panamerican Fiebre Aftosa* 1992; (58): 119-127.
5. Bergmann IE, Tiraboschi BH, Boller MAA, Malirat V, Pereira PJV, Augé de Mello P. Development of a more rapid and simple procedure for two-dimensional oligonucleotide analysis of foot-and-mouth disease virus: RNA minifingerprinting. *Bol Cent Panamerican Fiebre Aftosa* 1989; (55): 39-42.
6. Bergmann IE, Tiraboschi B, Mazzuca G, Fernandez E, Michailoff CA, Scodeller EA, La Torre JL. Serological and biochemical analysis of foot-and-mouth disease virus (serotype C3) isolated in Argentina between 1981 and 1986. *Vaccine* 1988; 6(3): 245-252.
7. Malirat V, Bergmann IE, Augé de Mello P, Tiraboschi B, Beck E, Gomes I. Genetic variation of foot-and-mouth disease virus during persistent infection in cattle. *Virus Res* 1994; 34 (1): 31-48.
8. Malirat V, Bergmann IE. Fiebre aftosa. Instrumentos moleculares para caracterización viral.: manual RT-PCR y secuenciamento cíclico para estudios de epidemiología molecular del virus de la fiebre aftosa. Rio de Janeiro: PANAFTOSA; 2002. (Serie de manuales didácticos 17).
9. Trinidad JJ, Malirat V, Bergmann IE. Heterogeneity among three foot-and-mouth disease subtype A<sub>24</sub> Cruzeiro virus strains used for the production of vaccines. *Bol Cent Panamerican Fiebre Aftosa* 1992;(58):79-86.

# Generalización del uso de pruebas serológicas en base a la detección de anticuerpos contra proteínas no estructurales para la vigilancia activa

*Ana María Espinoza*

Consultora – Perú

La demostración de que durante la infección por virus de la fiebre aftosa (FA) se producen anticuerpos contra el virion y contra proteínas no conformantes del virion (conocidas como proteínas no estructurales - PNE), fue la base para el desarrollo de técnicas serológicas para diferenciar animales que han experimentado replicación viral, independiente de su estado de vacunación, de aquellos animales inmunizados con vacunas en cuyo proceso de manufactura se han removido las PNE.

A finales de la década de los 80, el avance de los programas de control y erradicación de Fiebre Aftosa en Sudamérica, evidenció la necesidad de contar con pruebas para la detección de actividad viral subclínica en la población animal que revelara con mayor precisión la situación epidemiológica y sustentara la certificación de áreas libres de FA. Los estudios realizados por PANAFTOSA llevaron al desarrollo de un sistema conformado por una ELISA 3ABC indirecta como prueba tamiz seguida de un western blot (EITB) como ensayo confirmatorio. A su vez en otras regiones la necesidad de diferenciar animales infectados de vacunados, particularmente para los países que tuvieran que utilizar vacunación de emergencia, llevó al desarrollo de pruebas basadas en la detección de PNE.

A partir de los trabajos de PANAFTOSA, varias pruebas inmunoenzimáticas que usan distintos antígenos de PNE (recombinantes o sintéticos) fueron diseñados en laboratorios nacionales e internacionales de Estados Unidos y Europa (ELISA 2C Plum Island Animal Disease Center, ELISA 3B United Biomedical Inc – UBI, ELISA 3ABC de captura Pirbright /Brescia, ELISA 3ABC

competitivo Lindholm - Dinamarca, ELISA 3ABC INIA-España). A la fecha se tienen descritos otros ELISA-PNE que están en fase de investigación / validación. En la tabla 1 se presenta un resumen de las pruebas desarrolladas con la característica de los antígenos y la aplicación.

A fin de atender la demanda de estas pruebas, varios laboratorios han establecido convenios con empresas para la elaboración de kits-listos para usar, y están disponibles comercialmente ( Embrabio, Bommeli / Intervet, UBI). .

Ante la importancia del uso de los distintos ensayos en diferentes situaciones epidemiológicas, en los últimos años se han realizado actividades tendientes a lograr una armonización internacional como:

1. La Acción Concertada de la Unión Europea, que realizó estudios comparativos entre los reactivos de Pirbright/ Brescia y los de PANAFTOSA, con resultados muy similares
2. El Grupo Ad hoc OIE), que reúne a los expertos en el tema. Este Grupo optó por considerar al sistema de detección de ELISA 3ABC / EITB como prueba de referencia (index test) a ser descrito en el Manual de la OIE de edición 2004l.
3. El Programa Coordinado de Investigación (PCI) de la Agencia Internacional de Energía Atómica -IAEA de la FAO que en 1999, convocó a expertos en el tema y a participantes de 15 países de Asia, Sudamérica y Sudáfrica, a fin de armonizar el uso de varios ELISA-PNE y establecer la sensibilidad y especificidad diagnóstica en cada país. . De Sudamérica participaron laboratorios de Argentina (2) , Brasil (1)l, Colombia (1) Paraguay (1), Perú (1) y

**Tabla 1**  
**Pruebas de detección de anticuerpos contra PNE**

LABORATORIO	SISTEMA	ANTÍGENO	APLICACIÓN	COMENTARIOS
PANAFTOSA	ELISA -I EITB	3ABC- <i>E.coli</i> 3 A, 3B, 2C, 3ABC, 3D purificados	Bovinos (ovinos/capr) conjugado anti-especie	Prueba tamiz y Confirmatoria Uso en Sudamé rica para vigi- lancia activa
Pirbright/ Brescia	ELISA captura ELISA profile	3ABC- <i>E.coli</i> no purificado Monoclonal	Rumiantes Porcinos	Uso en Europa Diferenciación de infectados/ vacunados
United Biomedical Inc UBI -	ELISA- I	Péptidos Sintéticos 3 B, 3A	Rumiantes Porcinos	Usado en cerdos en Asia
INIA - España	ELISA -I	3ABC- <i>E.coli</i> purificado	Bovinos Porcinos	Usado en España
Plum Island Animal Disease Center- EEUU	Varios ELISA	2C, 3 A, 3B baculovirus	Rumiantes Porcinos	
Lindholm Dinamarca	ELISA competitiva	3ABC baculovirus no purificado monoclonal	Todas las especies	En fase de validación
IAEA-Geelong Otros	Varios ELISA	3ABC recombinante		En desarrollo/ validación

Uruguay (1). Bajo el PCI se analizaron sueros de animales infectados experimentalmente y/o de brotes, y sueros de bovinos vacunados y revacunados, correspondientes a zonas con diferentes estados sanitarios como son de área libre, áreas de bajo riesgo, áreas bajo vacunación sistemática, entre otras. Los estudios se realizaron con los reactivos de ELISA 3ABC y EITB de PANAFTOSA, ELISA 3ABC de Pirbright / Brescia, ELISA a péptidos de UBI y ELISA competitiva-Dinamarca. Los resultados se complementaron con otras técnicas como la detección de anticuerpos a proteínas estructurales, detección de anticuerpos anti-VIA, detección de portadores por aislamiento de virus de material esofágico-faríngeo y por PCR.

Los resultados del estudio comparativo del PCI muestran el comportamiento de los diferentes ensayos en las distintas condiciones de los países. En general, para los sueros bovinos, los ensayos que usan el antígeno 3ABC mostraron mayor sensibilidad comparado con

el antígeno de péptidos. Esto se observó tanto en los estudios de sensibilidad analítica como en las muestras de campo.

En tres de estos estudios se hizo un seguimiento de bovinos posterior a la infección, demostrándose la detección de anticuerpos contra PNE hasta por lo menos un año post infección (Figura 1)

En cuanto a la especificidad, los reactivos de ELISA con mayor sensibilidad mostraron menor especificidad, siendo que para el objetivo de detección de actividad viral para la vigilancia activa, el ELISA 3ABC demostró una muy alta sensibilidad, y alta especificidad usando el EITB como prueba confirmatoria.

Es importante anotar que estos estudios se realizaron entre 1999 y 2001, y algunos de los ensayos se trabajaron a partir de los biológicos recibidos y no como kits, y desde entonces se han producido cambios respecto a la performance de estos ensayos. En base a la experiencia del uso de reactivos no ensamblados como kits, para este año, cuarto del PCI, se considera sólo el uso de los kits-listos para usar.



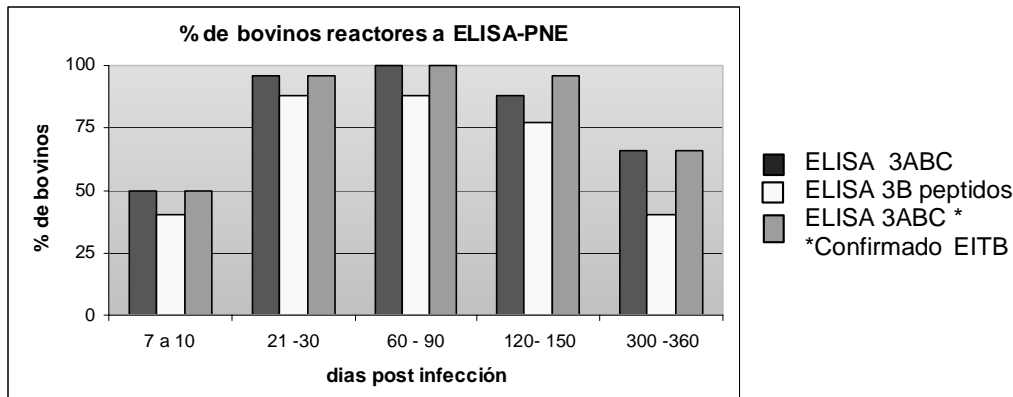


Fig. 1 - Resultados de ELISA-PNE, muestras de bovinos post-infección.

## SE CONCLUYE QUE

- Existe una demanda creciente de pruebas de detección de anticuerpos contra PNE a nivel mundial.
- Existen diferencias en la sensibilidad y especificidad de los diferentes reactivos / kits, pero a nivel poblacional las pruebas de PNE tienen similar desempeño.
- Es necesaria una armonización internacional con estándares (panel de sueros) entre los diferentes kits/reactivos disponibles.
- Se deberían establecer ajustes en los niveles de corte de las pruebas de PNE de acuerdo a situación (vigilancia activa, vacunación de emergencia).
- El uso de reactivos biológicos resulta en alta variabilidad, la provisión de kits mejora el desempeño y uniformidad de los ensayos.
- Es importante que las vacunas sean controladas respecto a la inducción de anticuerpos de PNE.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Berger HG, Straub OC, Ahl R, Tesar M, Marquardt O. Identification of foot-and-mouth disease virus replication in vaccinated cattle by antibodies to non-structural virus proteins. *Vaccine* 1990;8:213-216.
2. Bergmann IE, Augé de Mello P, Neitzert E, Beck E, Gomes I. Diagnosis of persistent aphthovirus infection and its differentiation from vaccination response in cattle by use of enzyme-linked immunoelectrotransfer blot analysis with bioengineered non-structural viral antigens. *Am J Vet Res* 1993; 54 (6): 825-831.
3. Bergmann IE, Malirat V, Neitzert E, Beck E, Panizzutti N, Sanchez C, Falczuk A. Improvement of a serodiagnostic strategy for foot-and-mouth disease virus surveillance in cattle under systematic vaccination: a combined system of an indirect ELISA 3ABC with an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay. *Arch Virol* 2000; 145: 473-489.
4. Diego M, Brocchi E, Mackay D, Simone F. The non-structural polyprotein 3ABC of foot-and-mouth disease virus as a diagnostic antigen in ELISA to differentiate infected from vaccinated cattle. *Arch Virol* 1997; 142: 2021-2033.
5. International Atomic Energy Agency, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Report of the Second Research Coordination Meeting of the Coordinated Research Programme on the use of non-structural antigens of foot-and-mouth disease virus to assess antibodies in vaccinated and infected livestock; 2002 March; Geelong, Australia.
6. Lubroth J, Brown F. Identification of native foot-and-mouth disease virus non-structural protein 2C as a serological indicator to differentiate infected from vaccinated livestock. *Res Vet Sci* 1995; 59: 70-78.
7. Malirat V, Neitzert E, Bergmann IE, Maradei E, Beck E. Detection of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus by means of an indirect ELISA test using bioengineered non-structural polyprotein 3ABC. *Vet Q* 1998; 20(2): 24-26.
8. Neitzert E, Beck E, Augé de Mello P, Gomes I, Bergmann IE. Expression of the Aphthovirus RNA Polymerase Gene in *Escherichia coli* and its use together with other bioengineered non-structural antigens in detection of late persistent infections. *Virology* 1991; 184: 799-804.
9. Rodríguez A, Dopazo J, Saiz JC, Sobrino F. Immunogenicity of non-structural proteins to foot-and-mouth disease virus differences between infected and vaccinated swine. *Arch Virol* 1994; 136: 123-131.
10. Shen F, Chen PD, Walfield AM, Ye J, House J, Brown F, Wang CY. Differentiation of convalescent animals from those vaccinated against foot-and-mouth disease by a peptide ELISA. *Vaccine* 1999; 17: 3039-3049.
11. Sorensen KJ, Hansen CM, Madsen ES, Madsen KG. Blocking ELISA's using the FMDV non-structural proteins 3D, 3AB and 3ABC produced in the baculovirus expression system. *Vet Q* 1998; 20 (2): 17-20.

# Visión de OIE en el uso de pruebas para la detección de proteínas no estructurales en la vigilancia de fiebre aftosa

Alejandro Schudel

Jefe del Departamento Científico y Técnico de la OIE

Office International des Épizooties - Organización Mundial de Sanidad Animal, París, Francia

## CAPÍTULO 2.1.1. - FIEBRE AFTOSA

### Artículo 2.1.1.1.

- A efectos del presente *Código*, el *período de incubación* de la fiebre aftosa es de 14 días.
- A efectos del presente Capítulo, los rumiantes incluyen también los camélidos.
- A efectos de *comercio internacional*, el presente Capítulo trata no sólo de la aparición de los signos clínicos causados por el virus de la fiebre aftosa, sino también de la presencia de infección por el virus de la fiebre aftosa en ausencia de signos clínicos de la enfermedad.

La presencia de infección por el virus de la fiebre aftosa queda demostrada en caso de:

1. aislamiento e identificación del virus de la fiebre aftosa en un animal o un producto derivado de dicho animal, o
2. detección de un antígeno viral o ARN viral, específicos de uno o varios serotipos del virus de la fiebre aftosa, en muestras procedentes de uno o varios animales que presentaron signos clínicos compatibles con la enfermedad, o epidemiológicamente relacionados con una sospecha o un *foco* confirmado de fiebre aftosa, o que dieron motivo para sospechar asociación o contacto previos con el virus de la fiebre aftosa, o
3. detección de anticuerpos dirigidos contra proteínas estructurales o no estructurales del virus de la fiebre aftosa, que no son consiguientes a una vacunación, en uno o más animales epidemiológicamente relacionados con una

sospecha o un *foco* confirmado de fiebre aftosa o que presentaron signos clínicos compatibles con una infección reciente por el virus de la fiebre aftosa.

Las normas para las pruebas de diagnóstico y las vacunas están descritas en el *Manual*.

### Artículo 2.1.1.2.

País libre de fiebre aftosa en el que no se aplica la vacunación

- no se ha registrado ningún *foco* de fiebre aftosa durante los 12 últimos meses;
- no se ha detectado ningún indicio de infección por el virus de la fiebre aftosa durante los 12 últimos meses;
- no se ha vacunado a ningún animal contra la fiebre aftosa durante los 12 últimos meses;
- no haber importado ningún animal vacunado contra la fiebre aftosa desde la suspensión de la vacunación

### Artículo 2.1.1.3.

País libre de fiebre aftosa en el que se aplica la vacunación

- a) Ausencia de focos por 2 años;
- b) Ausencia de infección durante los últimos 12 meses;
- c) la vacuna utilizada cumple con las normas descritas en el *Manual*.
- d) Si un país libre de fiebre aftosa en el que se practica la vacunación desea ser reconocido país libre de fiebre aftosa en el que no se aplica la vacunación, deberá esperar que transcurran 12 meses después de la suspensión de la vacunación y demostrar la ausencia de infección por el virus de la fiebre aftosa durante ese período.

#### **Artículo 2.1.1.4.**

Zona libre de fiebre aftosa en la que no se aplica la vacunación

Se podrá establecer una zona libre de fiebre aftosa en la que no se aplica la vacunación en un país libre de fiebre aftosa en el que se aplique la vacunación o en un país en el que algunas partes sigan estando infectadas de fiebre aftosa. La zona libre de fiebre aftosa deberá estar separada del resto del país y, si procede, de los países vecinos infectados, por una zona de vigilancia o por barreras físicas o geográficas asociadas a medidas zoonositarias que impidan realmente la introducción del virus. Un país en el que se vaya a establecer una zona libre de fiebre aftosa en la que no se aplica la vacunación deberá:

- a) no se ha registrado ningún *foco* de fiebre aftosa durante los 12 últimos meses;
- b) no se ha detectado ningún indicio de infección por el virus de la fiebre aftosa durante los 12 últimos meses;
- c) no se ha vacunado a ningún animal contra la fiebre aftosa durante los 12 últimos meses;
- d) no se ha introducido en la zona ningún animal vacunado desde la suspensión de la vacunación, excepto en el caso descrito en el Artículo 2.1.1.8.;

#### **Artículo 2.1.1.5.**

Zona libre de fiebre aftosa en la que se aplica la vacunación

Se podrá establecer una zona libre de fiebre aftosa en la que se aplica la vacunación en un país en el que exista una zona libre de fiebre aftosa en la que no se aplique la vacunación o en un país en el que algunas partes estén aún infectadas de fiebre aftosa. Un país en el que se vaya a establecer una zona libre de fiebre aftosa en la que se aplica la vacunación deberá:

- enviar a la OIE una declaración en la que exprese su deseo de establecer una zona libre de fiebre aftosa en la que se aplica la vacunación y certifique que no se ha registrado en ella ningún *foco* de fiebre aftosa durante los 2 últimos años;
- suministrar pruebas documentadas de que la vacuna utilizada cumple con las normas descritas en el *Manual*;
- suministrar pruebas documentadas de que existe un

sistema de vigilancia intensiva y periódica de la fiebre aftosa en la zona libre de fiebre aftosa en la que se aplica la vacunación.

Si un país en el que existe una zona libre de fiebre aftosa en la que se aplica la vacunación desea que esa zona sea reconocida zona libre de fiebre aftosa en la que no se aplica la vacunación, deberá esperar que transcurran 12 meses después de la suspensión de la vacunación y demostrar la ausencia de infección por el virus de la fiebre aftosa en dicha zona durante ese período.

#### **Artículo 2.1.1.7.**

Restitución del estatus de país o zona libre

1. En caso de aparición de un foco de fiebre aftosa o de una infección por el virus de la fiebre aftosa en un país o una zona libres de fiebre aftosa en los que no se aplica la vacunación, se requerirán los siguientes períodos de espera para que el país o la zona puedan volver a obtener el estatus de país o zona libres de fiebre aftosa en los que no se aplica la vacunación:

- a) 3 meses después del último caso, si se aplica el sacrificio sanitario y la vigilancia serológica, o
- b) 3 meses después del sacrificio del último animal vacunado, si se aplica el sacrificio sanitario, la vigilancia serológica y la vacunación en caso de emergencia,
- c) 6 meses después del último *caso* o de la última vacunación (teniendo en cuenta el más reciente de los dos), si se aplica el *sacrificio sanitario*, la vacunación en caso de emergencia sin el sacrificio de todos los animales vacunados y la vigilancia serológica, siempre y cuando las encuestas serológicas basadas en la detección de anticuerpos contra proteínas no estructurales del virus de la fiebre aftosa demuestren la ausencia de infección en el resto de la población vacunada.

2. En caso de aparición de un *foco* de fiebre aftosa o de una infección por el virus de la fiebre aftosa en un país o una zona libres de fiebre aftosa en los que se aplica la vacunación, el país o la zona recuperarán el

estatus de país o zona libres de fiebre aftosa en los que se aplica la vacunación al cabo de los siguientes períodos de espera:

- a) 6 meses después del último *caso*, si se aplica el *sacrificio sanitario*, la vigilancia serológica y la vacunación en caso de emergencia, siempre y cuando las encuestas serológicas basadas en la detección de anticuerpos contra proteínas no estructurales del virus de la fiebre aftosa demuestren la ausencia de infección, o.
- b) 12 meses después del último *caso*, si se aplica el

*sacrificio sanitario*, siempre y cuando se haya ejercido una vigilancia eficaz.

La solicitud de restitución del estatus de país o zona libres de fiebre aftosa, de acuerdo con los procedimientos arriba descritos, debe ser presentada a la OIE por el país interesado en el plazo de los 2 años consecutivos a la aparición del primer *foco* de fiebre aftosa o a la detección de la primera infección por el virus de la fiebre aftosa, de lo contrario se aplicarán las disposiciones contenidas en los Artículos 2.1.1.2., 2.1.1.3., 2.1.1.4. o 2.1.1.5., según los casos.

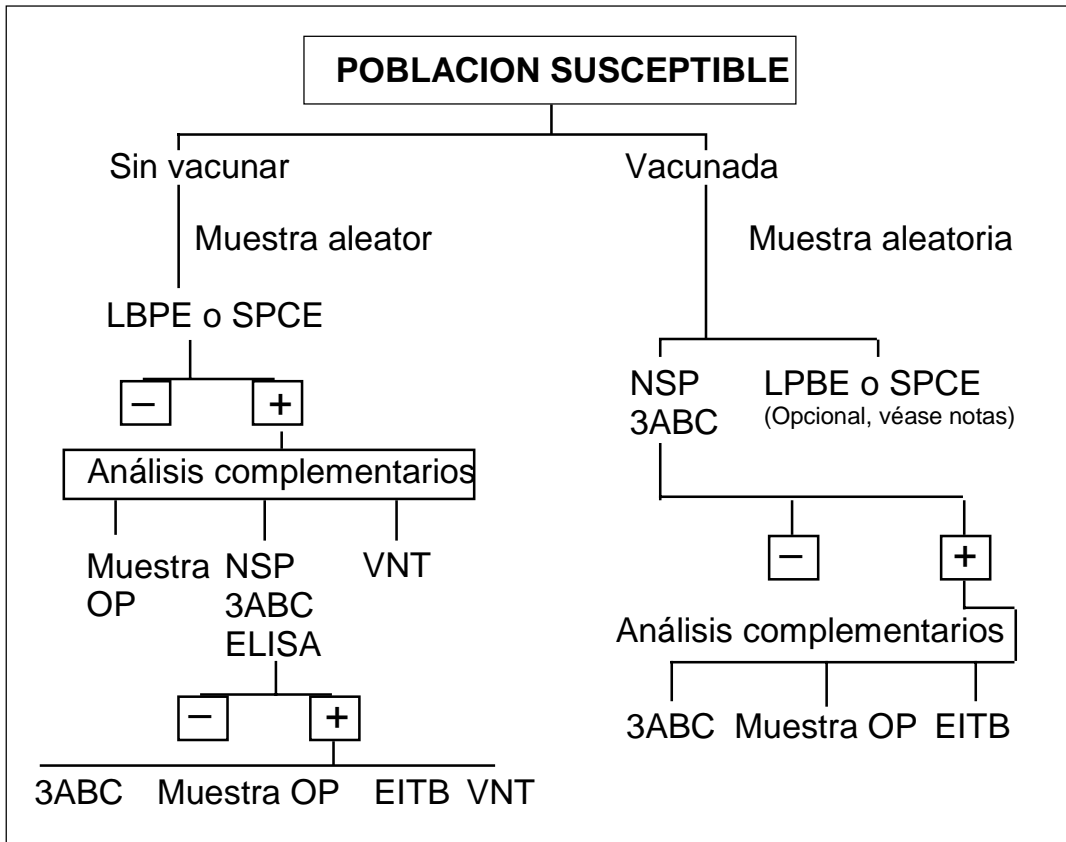
TABLA 1  
Validación del test 3ABC y EITB

DESCRIPTION	n	ELISA		EITB	
		DSp%	DSn%	DSp%	DSn%
Naïve cattle	12,804	99.05	–	100	–
Single vaccination	3,500	98.49	–	100	
Multiple vaccinations, age > 2years	2,517	95.20	–	99.68	–
Multiple vaccinations, age < 2years*	79,649	97.90	–	99.97	–
Natural infection, non-vaccination	1,000	–	98.80	-	98.80

TABLA 2  
Evaluación comparativa de los diferentes test para detección de anticuerpo contra NSP

Description	ELISA technique – DSn%					
	A	B	C	D	E	F
Vaccinated, infected, ~ 30 days post-infection	90.0	85.7	93.3	70.0	100	68.6
Vaccinated, infected, ~ 30–180 days post-infection	92.6	78.6	90.3	80.2	100	75.5

**Diagrama de uso de los test de detección de infección por el virus de Fiebre Aftosa en una población animal**



## **Módulo 2**

### **INSTRUMENTOS DE DISEÑO Y EPIDEMIOLÓGICOS EN LA VIGILANCIA DE FIEBRE AFTOSA**



## Aspectos de diseño para los estudios seroepidemiológicos de la vigilancia de Fiebre Aftosa

*Lic. Antonio Mendes*

PANAFTOSA - OPS/OMS

La ausencia de casos clínicos de una enfermedad como es la Fiebre Aftosa (FA) no es garantía de su ausencia. Por otra parte, el examen de todos los animales de la población bajo riesgo para probar la ausencia de la enfermedad y/o de la infección, mismo que se dispusiera de un teste infalible, es imposible de realizarse. Las encuestas sero-epidemiológicas, soportadas por fundamentos estadísticos y epidemiológicos, se constituyen en el único mecanismo de viable utilización para esta situación. La encuesta sero-epidemiológica por muestreo, entrega resultados en términos de la probabilidad de detección de la enfermedad o infección si ella estuviera/esta presente con una prevalencia igual o superior a un dado valor. Este

valor es fijado por el investigador teniendo en cuenta su experiencia y conocimiento sobre la epidemiología de la enfermedad (Cameron & Baldock, 1998a). La probabilidad de detección de la enfermedad o infección (i.e. de identificación de al menos un caso positivo) esta determinada por los siguientes parámetros: tamaño de la población blanco; número de unidades muestrales a ser examinadas a través del método diagnóstico; la sensibilidad del método de diagnóstico y la prevalencia mínima a ser investigada/detectada, conforme fijada por el investigador.

Estos aspectos hacen parte del Plan de Muestreo y tiene el propósito de enmarcar los aspectos técnicos que sostienen la Encuesta Sero-Epidemiológica para demostrar la ausencia de actividad viral.



# Una experiencia sobre la vigilancia y prevención de la Fiebre Aftosa en un país libre de Fiebre Aftosa

*J. Naranjo, MV., H. Rojas, MV., H. Galleguillos, MV., y ML. Dentone, MV.*

Departamento de Protección Pecuaria, SAG/Chile

Servicio Agrícola y Ganadero - Departamento de Protección Pecuaria

Chile es país libre de Fiebre Aftosa (FA) sin vacunación desde 1981, estatus que sólo se ha suspendido, en forma temporal, en dos ocasiones (1984 y 1987), ambas por el reingreso de la enfermedad desde un país limítrofe. Asimismo, el país es libre de todas las enfermedades de la lista A de OIE, y varias importantes de la lista B. Producto de alto nivel sanitario el país ha venido colocando en forma creciente productos pecuarios en el mercado internacional.

El escenario de sanidad animal mundial y regional ha presentado brotes de FA en diversos países que han aumentado el riesgo de introducción de esta enfermedad a países y zonas indemnes de FA.. Tal es el caso de Japón, Inglaterra, Francia, Holanda e Irlanda; así como en Argentina, Uruguay, Paraguay y Brasil (Riô grande do Sul).

A raíz del escenario de riesgo mencionado, y en especial aquella relativa a FA en el cono sur de América, el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) ha elaborado el Plan de Prevención de FA y de otras enfermedades exóticas con el objetivo de mitigar el riesgo de introducción de estas al territorio nacional, y en el caso de ingreso, detectarla oportunamente y erradicarla en el plazo más breve posible. Se ha definido como elementos de riesgos a la vecindad, importaciones pecuarias, tránsito de personas y vehículos, turismo, fauna silvestre migratoria, y bioterrorismo.

El plan de prevención contempla estrategias en tres niveles de prevención: 1) evitar introducción, 2) detección precoz, y 3) sistema de emergencia para erradicación.

En el primer nivel considera: análisis de riesgo, exigencias sanitarias de importación, evaluación de sistemas de atención veterinaria, reconocimiento de nivel sanitario de países y zonas, habilitación de establecimientos, control en barreras fronterizas internacionales y vigilancia epidemiológica transfrontera.

En el segundo nivel incluye componentes como: catastros poblacionales, sistema de información geográfico, caracterización de zonas de riesgo de introducción y de diseminación, vigilancia epidemiológica interna, atención de denuncia de sospechas de enfermedad, control sanitario y monitoreo sero-epidemiológico de poblaciones en riesgo, diagnóstico clínico y de laboratorio, educación sanitaria y capacitación.

El tercer nivel contempla: Plan maestro de emergencia, planes de contingencia por enfermedad, formación de grupos de emergencia, simulacros y capacitación.

La implementación del plan de prevención ha permitido mantener el país libre de FA desde 1987 a la fecha.

## **Módulo 3**

**EXPERIENCIAS NACIONALES SOBRE VIGILANCIA ACTIVA,  
EN BASE AL USO DE PRUEBAS SEROLÓGICAS Y VIROLÓGICAS.**



# Una experiencia sobre la vigilancia y prevención de la fiebre aftosa en un país libre de fiebre aftosa

*Hector Galleguillos*

Republica de Chile - Ministerio de Agricultura  
Servicio Agrícola y Ganadero - Departamento de Protección Pecuaria

## I. ANTECEDENTES

La Fiebre Aftosa es una de las enfermedades animales más contagiosa que se conoce en el mundo. Si bien no afecta a las personas, genera grandes pérdidas económicas directas a los ganaderos e industrias relacionadas, como mataderos, ferias, comercializadoras de insumos y otras, e indirectas como las ocasionadas en distintas actividades agrícolas.

En Chile, un foco de la enfermedad tendría un efecto directo inmediato de más de 600 millones de dólares, por lo que mantener al país libre de Fiebre Aftosa es una tarea fundamental en el aspecto económico y social.

Chile se declaró libre de Fiebre Aftosa sin vacunación en 1981, estatus que sólo se ha suspendido, en forma temporal, en dos ocasiones (1984 y 1987), ambas debido a la presencia de focos de la enfermedad por el ingreso ilegal de animales desde Argentina.

En Marzo de 2001, Argentina declaró nuevamente la presencia de nuevos focos de Fiebre Aftosa en su territorio; asimismo, en Junio de ese año, Uruguay también informó la presencia de focos de la enfermedad. Ambos países habían sido reconocidos como libres de Fiebre Aftosa por la Oficina Internacional de Epizootias (OIE).

A raíz de la aparición de estos focos en el Cono Sur, el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) elaboró el **Plan de Prevención de Fiebre Aftosa**, para impedir el ingreso de la enfermedad.

## II. PROPÓSITO

El plan de Prevención tiene como propósito mantener la condición de País Libre de Fiebre Aftosa Sin Vacunación reconocida por la OIE.

## III. COMPONENTES

Este plan se basa en 4 pilares fundamentales:

- a. *Alerta Sanitaria - Vigilancia Externa.* Su objetivo es conocer y analizar en detalle la situación epidemiológica de la enfermedad y las medidas de control que los países, especialmente los limítrofes, están llevando a cabo. Esto es con la finalidad de mantener en alerta al país y elaborar las medidas de prevención adecuadas.
- b. *Prevención de Ingreso de la Fiebre Aftosa.* Su objetivo es evitar el ingreso del virus de Fiebre Aftosa a Chile, por cualquier vía. Esto contempla animales, productos, subproductos, vegetales, personas y vehículos, ya sean ingresados a Chile formal o ilegalmente.
- c. *Detección Precoz (Vigilancia).* Su objetivo es detectar en el menor tiempo posible, en forma efectiva, el ingreso del virus de Fiebre Aftosa a Chile. Se busca que el caso índice corresponda al caso primario.
- d. *Respuesta Rápida y Efectiva (Emergencia).*

Su objetivo es actuar, frente a un evento de Fiebre Aftosa en Chile, de la forma más rápida y eficiente posible, de tal manera de recuperar el estatus sanitario del país en el menor tiempo.

## IV. RESULTADOS

Se ha mantenido un sistema de vigilancia y alerta de

la situación de Fiebre Aftosa a nivel internacional, donde se recibió la información sanitaria de los países que informan a la OIE y PANAFTOSA, especialmente; teniendo un especial énfasis en los países y territorios limítrofes, aquellos que constituyen socios comerciales y los que tienen o han tenido recientemente focos de la enfermedad. Además, se ha evaluado y analizado la situación de Fiebre Aftosa de estos países y el riesgo que constituyen para Chile; trabajándose en conjunto con ellos para minimizar la probabilidad de ingreso de la enfermedad.

Para prevenir el ingreso del virus, se han incrementado los esfuerzos en los controles zosanitarios internacionales a nivel de pasos y barreras fronterizas con el objeto de:

1. Garantizar que las importaciones de productos de riesgo se ajustan a la normativa sanitaria vigente.
2. Revisar a los pasajeros para impedir el ingreso ilegal de productos.
3. Desinfectar a las personas y vehículos que ingresan al país
4. Destruir los restos alimenticios de los vuelos internacionales

Se implementó, una campaña comunicacional en todo el país, destinada a dar a conocer la enfermedad y sus consecuencias. Ello contribuyó a obtener el apoyo y la colaboración de los productores, industriales, autoridades sociales y políticas locales y la comunidad en general.

Con el fin de detectar y controlar oportunamente el ingreso de animales de contrabando y la presencia de animales enfermos, no sólo de Fiebre Aftosa sino que de otras enfermedades exóticas; se establecieron **zonas despobladas** (460.000 há.), **en las veranadas** ubicadas entre la V a la IX región, donde no se permitió el pastoreo de animales.

La supervisión de estas zonas se realizó con la ayuda de Carabineros, instalándose puestos de avanzada en los lugares estratégicos de la alta cordillera, desde donde

operaron las brigadas de vigilancia de estas zonas.

Además, se establecieron **zonas de pastoreo bajo control** (2.315.000 há.), desde la IV a la IX región, donde se implementó un sistema de control e inspección de animales que suben y bajan de las veranadas. En esta zona, se identificaron en forma individual, aproximadamente, 390.000 animales y 3.500 ganaderos, con información detallada de los predios de origen, lugares de pastoreo y lugares de destino de los animales una vez que descienden de la veranada.

Se establecieron **brigadas**, compuestas por a lo menos un Médico Veterinario y Técnico del SAG, las que realizaron recorridos mensuales para efectuar inspecciones clínicas de los animales, en todas las veranadas de la zona bajo control; además, se tomaron aproximadamente, 12.500 muestras de sangre para el diagnóstico en el Laboratorio Oficial el SAG, resultando todas ellas negativas a Fiebre Aftosa.

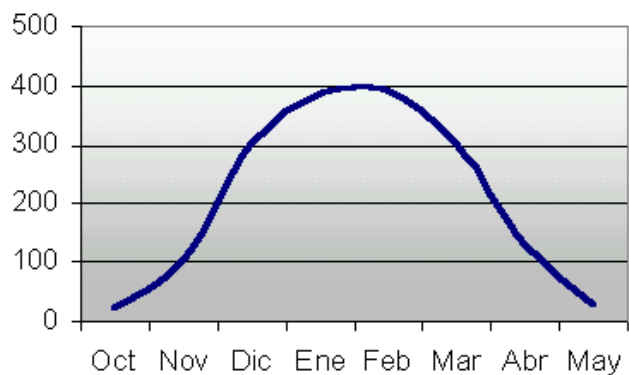


GRÁFICO 1

En el gráfico 1, se puede observar la evolución mensual de la población de animales en las veranadas controladas por el SAG; y en el cuadro 1, se observa la cantidad de animales autorizados por especie, ambas de la temporada 2001-02.

CUADRO 1

ESPECIE	BOVINOS	CAPRINOS	OVINOS	PORCINOS	EQUINOS
Nº de Animales	67.529	236.337	64.451	1.007	18.236

En la temporada de veranadas 2001-2002, se detectaron y detuvieron, con la cooperación de Carabineros, 10 eventos de contrabando de animales, las cuales involucraban a 209 animales (82,29% caprinos), provenientes principalmente de Argentina (92%).

Se establecieron **mayores medidas de vigilancia** en los establecimientos donde se reúnen animales, como las **ferias de ganado, los mataderos y centros de deportes ecuestres**. Con respecto a la vigilancia pasiva, todas las denuncias hechas al SAG sobre

patologías en animales fueron atendidas, poniéndose especial atención en aquellas que involucraban posibles casos de enfermedades vesiculares.

Se implementaron y probaron las medidas de contingencia en caso de un brote de la enfermedad, con el fin de garantizar un actuar rápido y efectivo, y controlar el foco evitando la diseminación.

Como resultado de las medidas tomadas NO se han registrado nuevos focos de la enfermedad, situación que se mantiene desde el año 1987, con lo que el país conserva el estatus de Libre Sin Vacunación.

# Vigilancia epidemiológica de fiebre aftosa en la Republica Argentina

## Muestreos serologicos 2002

Dr. Juan Dotta

SENASA - Argentina

El registro del número de focos es el indicador epidemiológico que refleja de manera más directa la evolución de la situación de la enfermedad. Ante la ausencia de casos clínicos, particularmente cuando se implementan campañas sistemáticas y masivas de vacunación, es necesario recurrir a otros indicadores que permitan evaluar la situación epidemiológica y los programas de lucha, como ser el nivel de actividad viral. Este se puede determinar mediante la estimación de la prevalencia de animales con anticuerpos contra proteínas no estructurales (PNE) del virus de la fiebre aftosa (VFA).

Entre los meses de marzo y junio de 2002 se realizó un muestreo serológico en todo el país con los siguientes objetivos:

- Estimar la actividad viral (VFA) en las regiones del país en donde se detectaron focos de la enfermedad durante el periodo 2000-2001.
- Descartar la presencia de animales infectados con el VFA en las regiones donde no se detectaron focos o donde su ocurrencia fue esporádica durante el periodo 2000-2001.

Se tomaron muestras de bovinos de dos categorías (6 a 12 meses y 1 a 2 años de edad) y de ovinos/caprinos. Los sueros bovinos se analizaron por los métodos de ELISA 3ABC y EITB en bovinos, y por VIAA-IDGA en ovinos/caprinos.

El país fue dividido en 3 zonas, basadas en las estrategias de vacunación implementadas y por la frecuencia de presentación de focos de FA. Las mismas fueron subdivididas en un total de 15 sub zonas, en las cuales se realizó un muestreo aleatorio en dos etapas.

Las siguientes tablas indican la cantidad de muestras obtenidas y los resultados, por zonas y por especies.

TABLA 1

**Total de muestras analizadas, por zona.**

ZONA	BOVINOS	OVINOS/CAPRINOS	TOTAL
A	21.671	9.171	30.842
B	14.893	-	14.893
C	5.292	17.990	23.282
<b>TOTAL</b>	<b>41.856</b>	<b>27.161</b>	<b>69.017</b>

TABLA 2

**Resultados**

(en % de animales positivos sobre el total de animales muestreados).

ESPECIE	ZONA	CATEGORIA			
		6 A 12 MESES		1 A 2 ANOS	
		% PREVALENCIA	I.C.	% PREVALENCIA	I.C.
BOVINA	A	0,63	0,43 -0,83	2,16	1,75-2,57
BOVINA	B	0,22	0,11-0,33	1,49	0,98-2,00
BOVINA	C	0,16	0,02-0,30	0,34	0,00-0,78

ESPECIE	ZONA	% PREVALENCIA	I.C.
OVINA CAPRINA	A	0,64	0,39-0,90
OVINA CAPRINA	C	0,00	-

### CONCLUSIONES

- Las muestras obtenidas y analizadas permitieron una estimación de los parámetros con alto grado de precisión.

- La prevalencia en los bovinos de 12 a 24 meses de edad fue mayor que en los de 6 a 12 meses.
- La relación entre las prevalencias observadas en los bovinos de las categorías 2 y 1, indican una importante reducción de la incidencia a través del tiempo.
- El rol del ovino/caprino en el mantenimiento y transmisión de la FA es secundario bajo las condiciones de producción y manejo como las existentes en nuestro país.
- La mayor actividad viral detectada en la Zona A, y en especial en las subzonas 1 y 5, es coincidente con el mayor número de focos observados en la epidemia 2000-2001.
- La prevalencia de bovinos positivos de 12 a 24 meses de edad de la subzona B9, fue similar a la observada en las subzonas 1 y 5 de la Zona A. Sin embargo la baja prevalencia encontrada en los bovinos de 6 a 12 meses indicaría que la exposición de los bovinos de 12 a 24 meses tuvo lugar mayoritariamente durante su primer año de vida. Esto es, que la incidencia de la infección decreció marcadamente a través del tiempo.
- Considerando la situación epidemiológica de fiebre aftosa existente durante el 2000 y el 2001, los niveles de prevalencia encontrados son, en términos generales, bajos, en muchos casos dentro del error de los métodos de análisis de laboratorio utilizados.

## **OTROS MUESTREOS**

En el transcurso de 2002 también se realizaron monitoreos en otras especies, también con el objetivo de estimar actividad viral.

Se hicieron muestreos en:

- Criaderos comerciales de ciervos.
- Biungulados silvestres de Patagonia (presas de caza mayor)
- Areas de veranada en la frontera argentino-chilena, en la provincia de Mendoza.

En estas especies se utilizaron pruebas de VAAA-IDGA y ELISA FI (Ac contra proteínas estructurales) para el virus A 2001 y O1. La totalidad de las muestras resultaron negativas a estas pruebas.



# Investigaciones seroepidemiológicas para demostrar la ausencia de infección por virus de la fiebre aftosa: la experiencia reciente en Brasil.

*Vitor Salvador Picão Gonçalves, PH.D.*

Epidemiólogo, Asesor del Departamento de Defensa Animal.

Ministerio de Agricultura, Pecuaria y Abastecimiento.

Facultad de Agronomía y Medicina Veterinaria - Universidad de Brasilia

Brasilia, DF - Brasil

Actualmente Brasil tiene una zona libre de fiebre aftosa donde se aplica la vacunación, que cubre 14 Unidades de la Federación. Otro estado, Rondônia, ya obtuvo aprobación de la Comisión de Fiebre Aftosa y otras Epizootias y espera el reconocimiento oficial de la OIE como zona libre con vacunación en mayo de 2003. Independientemente de los pre-requisitos establecidos por la OIE, las autoridades sanitarias brasileñas exigen que un estado o región demuestre que está libre de infección antes que pueda integrarse a la zona libre de fiebre aftosa, con o sin vacunación.

Con ese objetivo, el Departamento de Defensa Animal del Ministerio de Agricultura, Pecuaria y Abastecimiento adoptó la metodología patronizada para la realización de investigaciones seroepidemiológicas por muestreo que tengan por objetivo demostrar ausencia de infección por fiebre aftosa, a fin de dar consistencia y credibilidad al sistema de vigilancia activo que se aplica en todo el territorio nacional. La misma metodología se está utilizando para indicar zonas libres de otras enfermedades, como la peste suina clásica.

Los procedimientos metodológicos siguen la siguiente secuencia: (1) estratificación de la zona meta en subpoblaciones de muestreo, considerando los sistemas de producción y comercialización y su relación con la epidemiología de la enfermedad; (2) en cada subpoblación, efectuar muestreos transversales en dos etapas, con parámetros estadísticos y epidemiológicos previamente definidos, en los cuales la unidad epidemiológica principal es el rebaño, o un conglomerado de rebaños

contiguos, y la unidad epidemiológica secundaria es el animal; (3) selección del método de diagnóstico y de los procedimientos de investigación epidemiológica a ser utilizados, considerando la sensibilidad y especificidad de las pruebas y la definición clara de lo que constituye evidencia de actividad viral; (4) definición de los datos epidemiológicos a ser colectados para análisis posterior; y (5) definición del grupo etario que pueda elegirse para el muestreo considerando el método de diagnóstico y factores relacionados a la vacunación sistemática. Es muy importante considerar el adiestramiento de los equipos de campo y de laboratorio, debiéndose instalar también un sistema de información eficaz que permita mantener un control permanente sobre la calidad de los datos y sobre la ejecución del trabajo.

Desde 1999 se han realizado varias investigaciones seroepidemiológicas por muestreo que permitieron fundamentar la expansión progresiva de la actual zona libre. Desde entonces se colectaron muestras aleatoriamente de 3.058 conglomerados de rebaño bovinos y bubalinos y fueron sangrados 86.961 animales. Este número no incluye investigaciones serológicas complementarias, serología en ovinos, serologías de rutina, ni muestreos subsecuentes a los focos más recientes en Río Grande do Sul. **No se encontró ninguna evidencia de actividad viral en cualquier población donde se hizo muestreo.**

Toda la reactividad a las pruebas serológicas utilizadas (VIAA + EITB en 1999, ELISA 3ABC + EITB, en los otros años), fue asociada a la presencia

de proteínas no estructurales en vacunas comerciales. Eso quedó plenamente demostrado en trabajos experimentales y, especialmente, con el análisis epidemiológico de los resultados obtenidos. En el transcurso de los años fue posible construir un modelo epidemiológico de inducción vacunal de la

reacción al EITB, que ha servido de base para que las empresas productoras de vacuna, en colaboración con los órganos fiscalizadores y de investigación, encuentren una solución que permita aumentar la eficacia de las pruebas disponibles de diagnóstico, mejorando así el sistema de vigilancia.

## Investigaciones complementarias en focos de enfermedad vesicular.

*Dra. Olga Lucía Díaz M.*

Coordinadora Grupo Nacional de Epidemiología Veterinaria.

Instituto Colombiano Agropecuario ICA

Colombia es un país endémico tanto para fiebre aftosa como para estomatitis vesicular, con un promedio anual en los últimos 11 años, cercano a 1070 focos vesiculares. De éstos, anualmente existe un porcentaje en los cuales no se logra llegar a un diagnóstico final, ya sea porque no hubo toma de muestra epitelial, porque la muestra epitelial fue de mala calidad o porque las técnicas utilizadas rutinariamente en el Laboratorio Nacional de Enfermedades Vesiculares no arrojan un diagnóstico concluyente. De 1992 a 1998 este valor estuvo entre 46 y 56%. Estos focos quedaron finalmente clasificados como vesiculares clínicos.

A medida que se avanzó en el Programa de Control y Erradicación de Fiebre Aftosa en el país, con el

reconocimiento de zonas libres, se hizo prioritaria la necesidad de llegar a un diagnóstico final o de descartar al menos, la actividad del virus de fiebre aftosa en aquellas sospechas en donde no se había logrado tomar muestra epitelial o en las que su resultado era negativo a la prueba biológica realizada en el laboratorio.

A partir de 1999 se implementó la metodología de investigación epidemiológica complementar, con la que se pretende confirmar o descartar la actividad del virus de fiebre aftosa en focos vesiculares sin diagnóstico final. Las investigaciones se basan en las tres herramientas principales: serología, toma de líquido esofagofaríngeo y evaluación epidemiológica complementar.

# Estudios sero-epidemiológicos para fiebre aftosa. Uruguay 2001-2002

Gil, Andres <sup>1</sup>; Vitale, Edgardo <sup>1</sup>; Núñez, Alvaro <sup>2</sup>.

<sup>1</sup> MGAP, DGSG, Unidad de Epidemiología

<sup>2</sup> MGAP, DGSG, DILAVE M.C Rubino

Desde la epidemia del año 2001 se han realizado 5 muestreos sero-epidemiológicos. Estos estudios poblacionales han obedecido a distintos objetivos y por lo tanto se han realizado con diferentes diseños. A continuación se resumen los mismos:

## 1. ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE FIEBRE AFTOSA EN LA ESPECIE OVINA. Agosto de 2001

**1.1. Objetivo del muestreo:** Determinar la presencia de anticuerpos contra Fiebre Aftosa en la especie ovina en los establecimientos focos de la epidemia de Uruguay en el año 2001.

**1.2. Marco del muestreo:** Se tomó como marco del muestreo 818 establecimientos que son considerados predios focos que tienen más de 10 ovinos.

**1.3. Diseño del muestreo:** Se realizó un muestreo sistemático en dos etapas, seleccionando en una primera instancia los establecimientos y en una segunda etapa los ovinos.

**1.4. Tamaño de la muestra.** Se sortearon como unidades primarias **140 establecimientos** y luego como unidades secundarias se extrajo una muestra según cuadro adjunto. Se estimó lograr unas 7.500 muestras serológicas.

Población ovina en el predio	Muestra
= < 50	40
51 a 100	55
101 a 200	65
201 a 400	70
> 400	75

**1.5. Resultados:** se procesaron 7.017 muestras de sueros ovinos, Los resultados positivos al VIAA fueron 132 con un seroprevalencia de 1,9% (132/7017).

## 2. ESTUDIO TRANSVERSAL DE LOS ESTABLECIMIENTOS DE PRODUCCIÓN PECUARIA CON PRESENCIA DE LAS ESPECIES BOVINAS Y/O OVINAS. Setiembre de 2001

### 2.1. Objetivos:

**2.1.1.** determinar el grado de participación de las especies ovina y bovinas en la epidemia de la fiebre aftosa.

**2.1.2.** establecer el nivel de difusión de la enfermedad.

**2.2. Pruebas de Laboratorio:** VIAA para los ovinos y para los bovinos ELISA para detección de anticuerpos contra la proteína no estructural 3B.

**2.3. Muestreo:** se realizó un muestreo de carácter aleatorio en 2 etapas sobre las diferentes unidades de información: establecimientos y especies bovinas y ovinas. El número de establecimientos a muestrear propuestos fue de 210.

**2.4. Estrategia:** sobre el supuesto que el nivel de riesgo previsible estaba en función de la distancia en que se encontraban los animales susceptibles de los focos clínicos de la enfermedad, se propuso establecer 3 estratos geográficos con distintos niveles de riesgo:

**a. Estrato I:** integrado por las áreas pertenecientes a los establecimientos con focos clínicos y una zona "buffer" de 5 Km. a partir del epicentro del establecimiento foco.

**b. Estrato II:** integrado por un área geográfica que se

encuentra en el cinturón de más de 5 y dentro de 10 Km. de cada uno de los focos.

**c. Estrato III** :integrado por las áreas geográficas que están más allá de 10 Km. de los focos clínicos de la enfermedad.

Para la detección seropositivos con un nivel de confianza de 95% el número de bovinos muestreados son:

- a. Estrato I 15 bovinos por establecimiento.
- b. Estrato II 30 bovinos por establecimiento.
- c. Estrato III 60 bovinos por establecimiento.

**2.5. Ovinos** se intentó detectar establecimientos con 5% o más de los ovinos positivos, con un nivel de confianza del 90%, por lo cual se muestrearon 45 animales por establecimiento. En aquellos casos en que los establecimientos no contaran con el número de animales a muestrear se instruyó tomar toda la población disponible.

## **2.6. Resultados:**

**2.6.1. Bovinos:** se muestrearon 203 establecimientos y 6859 bovinos con 298 positivos. Se estimó la prevalencia en la población de bovinos en  $9,26\% \pm 2,28\%$  (ajustada por el diseño) y la misma por estratos geográficos fue: Estrato I =  $11,08\% \pm 2,89$ ; Estrato II =  $2,75\% \pm 0,84$  y Estrato III =  $2,07 \pm 0,93$ .

**2.6.2. Ovinos:** en ovinos se muestrearon 114 establecimientos y 6.573 ovinos (63 positivos). La proyección de la prevalencia general fue  $1,14\% \pm 0,50$  (ajustada por el diseño). La prevalencia en esta especie para cada uno de los estratos fue: Estrato I =  $1,69\% \pm 0,94$ , Estrato II =  $0,27\% \pm 0,14$  y en el Estrato III =  $1,10\% \pm 0,94$ .

## **3. ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE FIEBRE AFTOSA EN LA POBLACIÓN BOVINA 2002 DEL URUGUAY.** Febrero de 2002

### **3.1. Objetivos:**

- a. Establecer la situación seroepidemiológica de la población bovina
- b. Observar la evolución de las prevalencias detectadas con relación al estudio de setiembre del 2001.

**3.2. Pruebas de Laboratorio :** ELISA para detección de anticuerpos contra la proteína no-estructural 3B del virus de la fiebre aftosa.

**3.3. Marco de muestreo:** la base de datos ganadera de la Dirección General de Servicios Ganaderos a través de su división DICOSE, integrada con el Sistema de Información Geográfico (GIS) para la clasificación de los establecimientos según los 3 estratos del muestreo anterior.

**3.4. Diseño:** para poder comparar los resultados de este muestreo con el de setiembre del 2001 se entendió conveniente utilizar el mismo diseño y además se ajustó sub-estratificando en función de los giros Ganadería y Lechería. Estableciendo para el rubro lechería en la primera etapa un número de 20 establecimientos por estrato geográfico.

**3.5. Selección de las muestras:** Las muestras fueron seleccionadas aleatoriamente por la rutina de selección de muestras del programa Intercooled STATA versión 7.0 dentro de cada giro y estrato geográfico. El tamaño de muestra propuesto es de 230 establecimientos y aproximadamente 8.500 bovinos.

**3.6. Resultados:** la prevalencia aparente para la población de anticuerpos no estructurales fue de  $2,31\% \pm 0,79$ . Para el estrato I =  $2,77\%$ , para el II =  $2,41\%$  y para el III =  $0,63\%$ .

## **4. ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE FIEBRE AFTOSA EN LA POBLACIÓN OVINA 2002 DEL URUGUAY.** Mayo y Agosto del 2002.

### **4.1. Objetivo:**

Detectar si Uruguay tiene actividad viral en el 1% de sus majadas.

**4.2. Prueba de Laboratorio** VIAA por IDGA.

**4.3. Muestreo** fue de carácter aleatorio en 2 etapas sobre las diferentes unidades de información: establecimientos y dentro de estos la especie ovina. En la primera etapa de selección de establecimientos y sobre el supuesto de que se busca detectar al menos 1 establecimiento positivo si hay 1% o más de ovinos positivos con un 95% de confianza, se calculó un tamaño de muestra de 300 establecimientos.

**4.4. Marco de Muestreo** fue la base de datos de la declaración jurada de DICOSE de junio de 2001, la cual se estratificó en función de los brotes de fiebre aftosa en los 3 estratos anteriormente definidos. Considerando la estructura de la población del cuadro 1, también se estratificó en función del tamaño de los establecimientos. La toma de las muestras de animales se realizó en forma sistemática en cada establecimiento.

**4.5. Selección de las muestras:** Las muestras fueron seleccionadas aleatoriamente por la rutina de selección de muestras del programa Intercooled STATA version 7.0 dentro de cada uno de los estratos.

**4.6. Resultados:** el número de establecimientos muestreados fue de 340 y de ovinos de 18.296. La prevalencia aparente de anticuerpos anti-VIAA fue de 0.16% (ajustada por el diseño) y la distribución por estratos fue de 0,23% para el I, 0,08% para el II y 0,04% para el III.

CUADRO 1

**Distribución geográfica de establecimientos y población ovina en función del número de cabezas del mismo.**

Estratos	Establecimientos		Población Ovina	
	Nº	%	Nº	%
<b>Menos de 100</b>	7882	36,2	327277	3,0
<b>De 100-199</b>	3617	16,6	528793	4,8
<b>De 200-499</b>	4754	21,8	1540815	13,9
<b>De 500-1000</b>	2705	12,4	1915760	17,3
<b>Más 1000</b>	2835	13,0	6755466	61,0
	<b>21.793</b>	<b>100,0</b>	<b>11.068.111</b>	<b>100,0</b>

**5. MONITOREO DE LA POBLACIÓN VACUNA 2002. URUGUAY.** Noviembre-diciembre 2002.

**5.1. Objetivo:**

Este estudio buscará corroborar la situación sanitaria con respecto a Fiebre Aftosa y demostrar que más del 99% de los establecimientos están libres de infección.

**5.2. Pruebas de Laboratorio** se utilizó la prueba de ELISA para detección de anticuerpos contra la proteína no-estructural 3B del virus de la fiebre aftosa como prueba de screening. Considerando que la población bovina adulta tiene ya 4 vacunaciones se utilizó la prueba ELISA 3A para mejorar la especificidad, junto al estudio epidemiológico adecuado.

**5.3. Marco de muestreo:** se utilizó la base de datos ganadera de la Dirección General de Servicios Ganaderos a través de su división DICOSE del 2001.

**5.4. Diseño:** se realizó un muestreo aleatorio estratificado por giro de producción (Ganadería y Lechería) y dentro de estos estratos los establecimientos fueron seleccionados en forma proporcional a su población bovina. Este diseño buscó identificar establecimientos positivos si son iguales o superiores al 1% de la población y dentro de los establecimientos aquellos que pudieran tener 5% o más de reaccionantes positivos.

**5.5. Selección de las muestras:** Los establecimientos fueron seleccionados aleatoriamente en forma proporcional a su tamaño poblacional “PPS” por una rutina desarrollada para el paquete Intercooled STATA versión 7.0. En la primer etapa del muestreo se seleccionaron 124 establecimientos lecheros y 272 ganaderos. Dentro de cada establecimiento se seleccionaron en forma sistemática 30 vacas de cría, 15 terneros y 15 novillos adultos.

**5.6. Fecha prevista para resultados:** Marzo 2003.

## RESOLUCIÓN IV

### Seminario Internacional sobre el uso de herramientas serológicas y virológicas en la vigilancia activa

LA XXX REUNIÓN ORDINARIA DE LA COSALFA,

Considerando:

Los avances observados en la erradicación de la fiebre aftosa en Sudamérica durante la última década, como resultado del esfuerzo de los países y del desarrollo de una estrategia de lucha regionalizada;

Los cambios en la reglamentación internacional sobre fiebre aftosa, conforme establecido en el Capítulo 2.1.1 del Código Zoosanitario Internacional de la OIE y el desarrollo de guías sobre criterios mínimos de vigilancia que requieren una reorientación de la vigilancia epidemiológica en los países;

Que se dispone de herramientas serológicas y virológicas que permiten realizar el seguimiento e

investigación luego de un episodio, respecto al rastreo de origen y que han aportado un análisis más fino a la identificación del agente y su respuesta inmunológica;

Que la complejidad del campo, con sus procesos productivos y respectivos niveles de riesgo en cuanto al mantenimiento o difusión de la enfermedad, hace necesario un enfoque integrado laboratorio-campo para mejor interpretar los resultados obtenidos en las pruebas serológicas, y

La necesidad de seguir desarrollando las herramientas citadas conjuntamente con los métodos de muestreo que apoyen la vigilancia activa de la fiebre aftosa,

#### RESUELVE:

1. Que PANAFTOSA lidere las investigaciones sobre el desarrollo y adaptación de las pruebas serológicas y virológicas a los nuevos requerimientos; el desarrollo y puesta en práctica de esquemas de

muestreos para la vigilancia activa de la fiebre aftosa, así como de estudios sobre el conocimiento de la realidad epidemiológica de la enfermedad, de acuerdo a la propuesta de líneas de trabajo aprobadas durante el seminario, que va en anexo.

(Aprobada en la sesión plenaria del 14 de marzo de 2003)

## Anexo

### Seminario Internacional sobre el uso de herramientas serológicas y virológicas en la vigilancia activa

Considerando:

Los avances observados en la erradicación de la fiebre aftosa en Sudamérica durante la última década que resultaron del esfuerzo de los países y del desarrollo de una visión estratégica de lucha regionalizada;

Los cambios en la reglamentación internacional sobre fiebre aftosa, conforme establecido en el Capítulo 2.1.1 del Código Zoosanitario Internacional de la OIE y desarrollo de guías sobre criterios mínimos de vigilancia requieren una reorientación de la vigilancia epidemiológica en los países con énfasis en el desarrollo o adaptación de técnicas serológicas y virológicas y la aplicación de técnicas de investigación de terreno, para atender a los nuevos requerimientos;

Se dispone de herramientas serológicas y virológicas que permiten realizar el seguimiento e investigación

luego de un episodio respecto al rastreo de origen y que han aportado un análisis más fino a la identificación del agente y su respuesta inmunológica;

El uso del análisis filogenético puede auxiliar en la clasificación de agentes según orígenes comunes o su distribución en el terreno y que, sin embargo, la interpretación de estos resultados quedan perjudicados por el desconocimiento de los eslabones perdidos que puedan existir en la población analizada.

La complejidad del campo, con sus procesos productivos y sus niveles de riesgo en cuanto a la mantención o difusión de la enfermedad, hace necesario un enfoque integrado laboratorio-campo para mejor interpretar los resultados obtenidos en las pruebas serológicas.

#### RECOMIENDA:

1. Reafirmar la resolución de la XXIX COSALFA sobre el uso de kits completos.

- Utilizar kits validados según criterios internacionales. En caso de utilizar otros kits diferentes de los recomendados por OIE, garantizar la equivalencia de desempeño en la región.
- Establecer e implementar un formato del sistema diagnóstico para vigilancia activa armonizado en la región, que incluya pruebas tamiz y confirmatorias bajo la coordinación de PANAFTOSA.
- Armonizar los criterios de análisis e interpretación en la región, siguiendo los procedimientos y criterios recomendados por PANAFTOSA.
- Instar a los países a colaborar con el envío de sueros relevantes, para la conformación del banco de sueros de referencia necesarios para sustentar la incorporación del sistema I-ELISA 3ABC / EITB como test de referencia de OIE.
- Fortalecer los programas de capacitación y control de calidad interno en los países.
- Efectuar un control permanente que asegure la no interferencia de PNC antigénicas vacunales en los programas de erradicación.
- Conformar un foro permanente de intercambio de información que garantice la armonización, equivalencia y transparencia de la utilización de estas pruebas en respuesta a las necesidades de un programa regional.



2. Instar a los países a la colecta y envío de muestras apropiadas, incluyendo las necesarias para diagnóstico diferencial, participando conjuntamente con PANAFTOSA en los estudios de caracterización de muestras de campo.

3. Instar a los países a colaborar y consolidar la propuesta de proyecto presentada por PANAFTOSA acerca de estudios sobre la posibilidad de que animales persistentemente infectados sean capaces de transmitir el virus de la fiebre aftosa y evaluar la eventual manifestación clínica. Adicionalmente, si necesario, desarrollar estudios poblacionales dirigidos y técnicas

de muestreo con visión epidemiológico-productiva a los nuevos requerimientos.

Promover el análisis conjunto y comparativo de los resultados disponibles en los países, relacionado a las encuestas serológicas que se han efectuado en diferentes situaciones de campo en la región, integrando el análisis del laboratorio con la investigación epidemiológica.

4. Que por la relevancia del tema, PANAFTOSA organice un Seminario-taller para discutir los temas arriba mencionados.

## AGENDA

<hr/> <b>LUNES - 10 de Marzo</b> <hr/> <p>09:00 <b>APERTURA</b> <i>Dr. Eduardo Correa Melo - PANAFTOSA</i></p> <p>09:30 <b>MÓDULO 1</b> <b>Instrumentos de diagnóstico para la vigilancia de Fiebre Aftosa.</b></p> <p>Herramientas diagnósticas para la Fiebre Aftosa. <i>Dra. Ingrid Bergmann - PANAFTOSA</i></p> <p>10:00 Pruebas serológicas y virológicas para la vigilancia activa. <i>Dra. Ingrid Bergmann - PANAFTOSA</i></p> <p>10:40 RECESO</p> <p>11:00 Epidemiología molecular en la vigilancia. <i>Dra. Viviana Malirat - PANAFTOSA</i></p> <p>11:30 Generalización del uso de pruebas serológicas en base a detección de proteínas no estructurales para la vigilancia activa. <i>Dra. Ana Maria Espinoza - Consultora - Peru</i></p> <p>12:00 Visión de OIE en el uso de pruebas para la detección de proteínas no estructurales en la vigilancia de Fiebre Aftosa. <i>Dr. Alejandro Schudel - Oficina Internacional de Epizootias-OIE</i></p> <p>12:40 DISCUSIÓN</p> <p>13:15 ALMUERZO</p> <p>14:30 <b>MÓDULO 2</b> <b>Instrumentos de diseño y epidemiológicos en la Vigilancia de Fiebre Aftosa.</b> Bases para la vigilancia de Fiebre Aftosa considerando lo relacionado a la recuperación del status de país libre de Fiebre Aftosa. <i>Dr. Eduardo Correa Melo - PANAFTOSA</i></p>	<p>15:00 Aspectos de diseño para los estudios seroepidemiológicos de la vigilancia de Fiebre Aftosa. <i>Lic. Antonio Mendes - PANAFTOSA</i></p> <p>16:00 RECESO</p> <p>16:30 Una experiencia sobre la vigilancia y prevención de la Fiebre Aftosa en un país libre de Fiebre Aftosa. SAG/Chile</p> <hr/> <p><b>MARTES - 11 de Marzo</b></p> <p>08:30 <b>MÓDULO 3</b> <b>Experiencias nacionales sobre vigilancia activa, en base al uso de pruebas serológicas y virológicas.</b></p> <p>Presentaciones de Argentina - Brasil - Chile - Colombia - Uruguay</p> <p>10:30 RECESO</p> <p>11:00 Continuación de las experiencias Nacionales</p> <p>13:00 ALMUERZO</p> <p>14:30 DISCUSIÓN</p> <p>16:00 RECESO</p> <p>16:30 <b>CONCLUSIONES y RECOMENDACIONES</b> <b>Resolución IV de la COSALFA</b></p> <p>17:30 <b>ENCERRAMIENTO DEL SEMINARIO</b></p>
--	--

*Editado en 2003*



**Organización Panamericana de la Salud**  
**Organización Mundial de la Salud**  
**CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA**

Salud Pública Veterinaria