









Comparação de sete diferentes RT-qPCR para detecção do vírus da febre aftosa

Comparison of seven different RT-qPCR for diagnostic of Foot-and-Mouth disease virus

Antonio Augusto Fonseca Junior*¹ , Mateus Laguardia-Nascimento¹ , Amanda Petrina Scotá Ferreira¹ ,
René Ribeiro da Silva² , Anselmo Vasconcelos Rivetti Júnior¹ , Marcelo Fernandes Camargos¹ 

¹Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Minas Gerais (LFDA/MG), Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brazil

²Laboratório Federal de Defesa Agropecuária do Pará, Belém, Pará, Brazil

* autor correspondente: antonio.fonseca@agro.gov.br

Resumo: O diagnóstico rápido e preciso de surtos de febre aftosa é crucial para conter a rápida transmissão de seu agente causador, o vírus da febre aftosa (FMDV), que representa uma ameaça significativa ao gado do país. Este estudo teve como objetivo realizar uma análise comparativa de vários métodos de RT-qPCR para a detecção do FMDV. Os métodos avaliados para a região 3D demonstraram sensibilidade e especificidade semelhantes. No entanto, foram observadas diferenças notáveis em amostras com baixa concentração de RNA. Embora esses métodos possam ser utilizados de forma intercambiável com resultados consistentes ao lidar com um grande número de amostras enviadas ao laboratório para identificar um surto, variações sutis podem assumir importância ao trabalhar com uma quantidade limitada de amostras contendo baixas cópias de RNA do FMDV.

Palavras-chave: RT-qPCR; febre aftosa; diagnóstico; repetibilidade

Abstract: The prompt and accurate diagnosis of foot-and-mouth disease outbreaks is crucial to curb the swift transmission of its causative agent, the foot-and-mouth disease virus (FMDV), which poses a substantial threat to the nation's livestock. This study aimed to perform a comparative analysis of various RT-qPCR methods for the detection of FMDV. The methods evaluated for the 3D region demonstrated similar sensitivity and specificity. Nevertheless, noticeable distinctions emerged in samples with low RNA concentration. While these methods can be interchangeably utilized with consistent outcomes when handling a large number of samples sent to the laboratory to pinpoint an outbreak, minor variations may assume significance when working with a limited quantity of samples containing low FMDV RNA copies.

Keywords: RT-qPCR; foot-and-mouth disease; diagnosis; repeatability

Recebido: 31 de maio, 2023. Aceito: 14 de novembro, 2023. Publicado: 08 de janeiro, 2024.

1. Introdução

Surtos de febre aftosa exigem um diagnóstico rápido e preciso para prevenir a rápida propagação do seu agente etiológico, o vírus da febre aftosa (FMDV), que pode causar danos profundos ao gado do país ⁽¹⁾. O FMDV pertence ao gênero *Aphthovirus*, família *Picornaviridae*, e é um vírus de RNA de fita simples positiva ⁽²⁾. Os sinais clínicos da doença incluem febre, inquietação, salivação, dificuldade em mastigar e engolir alimentos, tremores, diminuição da produção de leite, lesões nos pés e claudicação. No entanto, a característica mais marcante da doença são as vesículas que podem aparecer na boca, nas tetas e nos dedos dos animais ⁽¹⁾.

A disseminação global do FMDV entre os rebanhos é uma preocupação significativa devido ao aumento do comércio global e ao trânsito de animais nos últimos anos. A vigilância é necessária, pois o vírus pode ser transmitido pelo contato direto entre animais ou através de produtos de origem animal. Por exemplo, o surto de 2005 no Brasil provavelmente foi causado pelo trânsito ilegal de animais ⁽³⁾, enquanto o surto de 2001 no Reino Unido ocorreu devido à alimentação de porcos com restos de comida contaminados ⁽⁴⁾.

O primeiro passo para um bom diagnóstico é uma detecção adequada e rápida no campo, com a coleta de amostras para envio ao laboratório. A detecção rápida e confiável do FMDV é crucial no combate à doença. Os métodos utilizados devem ser sensíveis o suficiente para detectar pequenas quantidades do vírus e específicos o suficiente para evitar diagnósticos incorretos, que podem levar a atrasos e perdas substanciais. O impacto de um diagnóstico positivo de FMDV no gado de um país pode durar meses ou até anos até que um status livre de vírus e livre de vacinação seja alcançado ⁽⁵⁾.

Os principais métodos para detectar o FMDV incluem técnicas sorológicas, isolamento viral e técnicas moleculares. Os métodos moleculares desempenham um papel vital no diagnóstico laboratorial, principalmente na detecção de RNA viral. Amostras usadas para testes tipicamente incluem *swabs* nasais, orais ou lesados, tecido epitelial, fluido vesicular ou fluido oral ⁽⁶⁾. A região 3D é o principal alvo para oligonucleotídeos em métodos moleculares, embora regiões como IRES e 5' UTR também sejam utilizadas ⁽⁷⁻⁹⁾. Essas três regiões são altamente conservadas entre os sorotipos, teoricamente permitindo a detecção de todos eles, embora existam falhas na detecção de isolados específicos de algumas regiões, o que torna importante o uso de mais de um PCR. VP1 é outro alvo para RT-PCR, usado principalmente para diferenciação de sorotipos ⁽¹⁰⁾.

O desenvolvimento e avaliação completos de métodos diagnósticos são essenciais, particularmente para uma doença importante como a febre aftosa. A validação de técnicas é crucial, incluindo o teste de fatores como extração de RNA, efeito de matriz, incerteza de medição e precisão ⁽¹¹⁾. Os oligonucleotídeos podem exigir atualizações regulares para garantir a detecção precisa de diferentes cepas do vírus, pois o genoma de RNA do FMDV exibe características evolutivas únicas ⁽¹²⁾. Regiões endêmicas experimentam a circulação de vários sorotipos e topótipos do vírus da febre aftosa (FMDV), levando a consequências locais significativas. Além disso, introduções em novas áreas são uma fonte de grande preocupação. De fato, os últimos anos testemunharam vários surtos de FMDV decorrentes de topótipos que

cruzaram fronteiras, ocorrendo em diversas regiões do globo. Em ambos os cenários, o diagnóstico rápido e preciso, incluindo a determinação do sorotipo e topótipo responsáveis por esses surtos, é vital para implementar as medidas mais eficientes e adequadas para conter a disseminação da doença ⁽¹³⁾. Testes interlaboratoriais são comuns em países com estruturas de diagnóstico descentralizadas e entre países que realizam testes de proficiência regulares para avaliar seus ensaios ⁽¹⁰⁾.

O objetivo deste estudo foi realizar uma análise comparativa de diferentes métodos RT-qPCR para detectar FMDV. Os métodos foram comparados com base na eficiência de amplificação, limite de detecção, repetibilidade e sensibilidade diagnóstica.

2. Material e Métodos

2.1 RT-qPCR

As técnicas testadas e as concentrações de reagentes estão listadas na Tabela 1. Todos os testes foram realizados utilizando o master mix QuantiNova Probe RT-PCR (Qiagen, Alemanha). O experimento inteiro foi realizado no termociclador CFX96 (BioRad, Estados Unidos). O RT-qPCR FMDV.3D.183 foi modificado para química Taqman, utilizando a sonda descrita na Tabela 1. Optamos por essa modificação em uma tentativa de adaptar um método de química qPCR comumente usado. O RT-qPCR FMDV.3D.99 ⁽¹⁴⁾ também foi modificado pela incorporação de novos oligos para garantir a detecção de cepas virais com desalinhamento em comparação com as sequências do *GenBank*. Todos os RT-qPCRs foram comparados ao FMDV.3D.107, uma técnica sugerida pela Organização Mundial de Saúde Animal.

Tabela 1 Oligonucleotídeos e protocolos de PCR usados neste estudo.

RT-qPCR	Oligonucleotídeos	Sequências	PCR Mix	Referências
FMDV.3D.107	FMDV.3D.107.F	ACTGGGTTTTACAACCTGTGA	12.5 µL QuantiNova RT-qPCR (Qiagen, Germany), Primers 0.4 µM, Probe 0.2 µM, 3 µL amostra, water q.s. 25 µL (1) 95°C 5 minutos, (45) 95°C 10 segundos, 60 °C 60 segundos	(7)
	FMDV.3D.107.R	GCGAGTCCTGCCACGGA		
	FMDV.3D.107.S	FAM-TCCTT TGCAC GC-CGT GGGAC-BHQ1		
FMDV.3D.99	FMDV.3D.99.F1	ACTGGGTTTTACAACCTGTGATG	12.5 µL QuantiNova RT-qPCR (Qiagen, Germany), Primers 0.4 µM, Sonda 0.2 µM, 3 µL amostra, água q.s. 25 µL (1) 95°C 5 minutos, (45) 95°C 10 segundos, 60 °C 60 segundos	(24)
	FMDV.3D.99.F2	CTGGGTTTTATAAACCTGTGATGGC		
	FMDV.3D.99.R1	CCACGGAGATCAACTTCTCCT		
	FMDV.3D.99.R2	TGCCACAGAGATCAACTTCTCC		
	FMDV.3D.99.R3	CCACGGAAATCAACTTCTCCTG		
FMDV.3D.99.S	FAM-TCTCCTTGCAC-GCCGTGG-BHQ1			

FMDV.3D.130	FMDV.3D.130.F	GGACCATACAGGAGAAGTTGA	12.5 µL QuantiNova RT-qPCR (Qiagen, Germany), Primers 0.4 µM, Sonda 0.2 µM, 3 µL amostra, água q.s. 25 µL (1) 95°C 5 minutos, (45) 95°C 10 segundos, 60 °C 60 segundos	(25)
	FMDV.3D.130.R	CGCAGGTAAAGTGATCTGTAGC		
	FMDV.3D.130.S	FAM-CTCCGTGGCAG-GACTCGCAGT-BHQ1		
FMDV.3D.183	FMDV.3D.183.F	GAC AAA GGT TTT GTT CTT GGT CA	12.5 µL QuantiNova RT-qPCR (Qiagen, Germany), Primers 0.6 µM, Sonda 0.3 µM, 3 µL amostra, água q.s. 25 µL (1) 95°C 5 minutos, (45) 95°C 10 segundos, 60 °C 60 segundos	(26)
	FMDV.3D.183.R	TGCGAGTCTGCCACGGA		
	FMDV.3D.183.S	FAM-ATC CTC TCC TTT GCA CGC CGT GGG ACC AT-BHQ1		
FMDV.IRES.145	FMDV.IRES.145.F	TAA CAW GGA CCC RCS GGG CC	12.5 µL QuantiNova RT-qPCR (Qiagen, Germany), Primers 0.4 µM, Sonda 0.2 µM, 3 µL amostra, água q.s. 25 µL (1) 95°C 5 minutos, (45) 95°C 10 segundos, 60 °C 60 segundos	(27)
	FMDV.IRES.145.R	TGA AGG GCA TCC TTA GCC TG		
	FMDV.IRES.145.S	FAM - CAT GTG TGC AAY CCC AGC ACR G - BHQ		
FMDV.3D.88	FMDV.3D.88.F	ACTGGGTTTTAWAACCTGTGATG	12.5 µL QuantiNova RT-qPCR (Qiagen, Germany), Primers 0.4 µM, Sonda 0.2 µM, 3 µL amostra, água q.s. 25 µL (1) 95°C 5 minutos, (45) 95°C 10 segundos, 60 °C 60 segundos	(17)
	FMDV.3D.88.R	TCAACTTCTCTGKATGGTCCCA		
	FMDV.3D.88.S	FAM-ATCCTCTCCTTTG-CACGC-lowa Black		

2.2 Extração de RNA

O RNA de todas as amostras testadas neste estudo foi extraído usando Trizol (Thermofisher, Estados Unidos). 200 µl de suspensão viral ou 50 mg de tecido foram adicionados a 1 ml de Trizol. Posteriormente, 200 µL de clorofórmio foi adicionado à solução. Após a homogeneização, a centrifugação foi realizada a 12.000 g por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e misturado com 500 µL de isopropanol. Em seguida, foi centrifugado a 12.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e 1.000 µL de etanol foi adicionado. A centrifugação foi realizada a 7.500 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 100 µL de água destilada.

2.3 Sensibilidade

A sensibilidade e especificidade das técnicas foram comparadas usando diferentes grupos de amostras. As amostras positivas utilizadas neste experimento foram divididas em três tipos: um plasmídeo, quatro isolados (amostras de campo que foram cultivadas em células) e dezesseis amostras clínicas de surtos de febre aftosa. O plasmídeo utilizado continha um

inseto com sequências alvo para todos os PCR em pTwist Amp High Copy (Molecular Brazil, Brasil). Amostras de isolados foram obtidas de surtos de febre aftosa na América Latina e Ásia (Tabela 2) e multiplicadas em células BHK21. As suspensões celulares foram congeladas e, após o descongelamento, a centrifugação foi realizada a 3.000 g por dez minutos. O sobrenadante foi coletado e submetido à extração de RNA.

Amostras de surtos (tecidos coletados/amostras com diagnóstico confirmado por isolamento viral) foram fornecidas pelo Lanagro/PA. Todas foram coletadas durante o surto de 2005 no Mato Grosso do Sul. O epitélio com lesões características na língua e nas patas foi coletado e submetido ao isolamento viral. Tecidos com isolamento positivo para FMDV foram congelados a -70°C até serem usados para a extração de RNA neste trabalho e posteriormente submetidos à extração de RNA.

2.4 Especificidade

As amostras negativas utilizadas no teste de especificidade foram divididas em dois grupos. O primeiro grupo consistiu em vinte e quatro amostras com suspeita de doença vesicular que foram enviadas ao laboratório e testadas sorologicamente, por isolamento viral e por RT-qPCR, como é rotina para o laboratório oficial do Ministério da Agricultura e Pecuária do Brasil. Essas amostras apresentaram resultado positivo em testes de diagnóstico diferencial para estomatite vesicular, estomatite papulosa bovina, *pseudocowpox* e *vacínia*. O segundo grupo de amostras negativas compreendeu 30 fragmentos de epitélio bovino sem lesões características de doença vesicular.

2.5 Repetibilidade

Testes de repetibilidade foram realizados para comparar FMDV.3D.107 com as outras técnicas de RT-qPCR descritas neste trabalho. O objetivo era verificar a resposta das técnicas contra sete amostras (tecido positivo em isolamento viral e RT-PCR). O RNA dessas amostras foi extraído conforme descrito acima. Cada uma das sete amostras foi submetida a RT-qPCR em triplicata durante três rodadas diferentes, ou seja, em três momentos diferentes com a preparação de novos reagentes. As sete amostras foram submetidas à transcrição reversa e amplificação, sempre em triplicata.

Os valores de Ct foram registrados para comparação estatística. A repetibilidade e incerteza de medição de cada teste individual foram anotadas e comparadas com o FMDV.3D.107. Os valores do ciclo limiar (Ct) obtidos em triplicata de cada amostra foram avaliados considerando as variações entre as rodadas em uma análise de variância (ANOVA) para determinar as variações de repetibilidade. Outro teste foi realizado para verificar a repetibilidade e reprodutibilidade dos métodos, que foi um teste interlaboratorial. Um laboratório externo preparou dezoito amostras contaminadas com FMDV de diferentes sorotipos em várias concentrações e as enviou para análise. O RNA foi extraído conforme descrito anteriormente e submetido a todas as técnicas.

3. Resultados

3.1 RT-qPCR

Os RT-qPCRs foram padronizados e comparados com o FMDV.3D.107, que já estava em uso no laboratório. A Tabela 2 lista os valores de eficiência e limites de detecção obtidos usando diluições de dez vezes do plasmídeo e isolados de FMDV, incluindo A24 Cruzeiro (105,5 TCID₅₀/50µL), C3 Indaial (105,5 TCID₅₀/50µL), O1 Campos (105,2 TCID₅₀/50µL) e SAT-1 (103,9 TCID₅₀/50µL). O FMDV.IRES.145 apresentou a menor eficiência, abaixo de 90%, no teste realizado. A modificação das concentrações de oligo não melhorou o limite de detecção; portanto, foi excluído dos testes subsequentes.

Tabela 2 Eficiência de RT-qPCR e sensibilidade analítica

RTqPCR	Efficiency	Plasmídeo		FMDV A		FMDV C		FMDV O		FMDV SAT	
		Última diluição positiva*	MédiaCt**	Última diluição positiva*	MédiaCt	Última diluição positiva*	MédiaCt	Última diluição positiva*	MédiaCt	Última diluição positiva*	MédiaCt
FMDV.3D.107	96.2%	-5 x3	39.47 (0.54)	-7 x2	40.56 (0.3)	-8 x2	40.59 (0.83)	-5 x2	39.67	-6 x2	41.06 (0.21)
FMDV.3D.88	98.7%	-5 x3	39.2 (0.34)	-7 x2	40.1 (0.8)	-7 x2	43.48 (2.46)	-6 x3	x35.99 (0.30)	-6 x3	39.75 (0.42)
FMDV.3D.99	99%	-5 x2	37.91 (1,2)	-7 x2	39.41 (0.96)	-8 x3	38.51 (2.23)	-5 x3	37.86	-7 x1	37,89
FMDV.3D.130	93%	-5 x3	37.94 (0.83)	-7 x3	37.88 (0.794)	-8 x3	39,18 (0.34)	-5 x3	39,34	-6 x1	38.81
FMDV.3D.183	91.2%	-7 x3	39.78 (0.71)	-7 x3	36.31 (1.03)	-7 x3	36.92 (0+95)	-5 x1	37.64	-6 x1	36.57

*Última diluição positiva e número de replicatas positivas.

** Ct mediano e desvio padrão.

3.2 Especificidade

FMDV.3D.88 e FMDV.3D.130 não apresentaram nenhuma amplificação não específica. FMDV.3D.107 amplificou uma amostra epitelial de uma língua bovina com um Ct de 43,5. FMDV.3D.99 apresentou amplificação com um Ct de 43,26. FMDV.3D.183 amplificou cinco amostras com valores de Ct variando de 41 a 44. As curvas observadas não exibiram o perfil típico das curvas de qPCR, indicando amplificação não específica.

3.3 Sensibilidade

Todas as amostras de surtos de febre aftosa foram amplificadas nas técnicas testadas, exceto FMDV.3D.130. Duas amostras não amplificaram e apresentaram valores de Ct acima de 38 nos outros testes de RT-qPCR. FMDV.3D.88 não conseguiu amplificar uma dessas amostras. FMDV.3D.99 consistentemente mostrou resultados de Ct mais baixos para todas as amostras. Os resultados estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 Resultados de Ct para RNA extraído de epitélio de surto de FMDV.

Sample*	FMDV.3D.107	FMDV.3D.88	FMDV.3D.99	FMDV.3D.130	FMDV.3D.183
1	26.18	26.70	25.23	26.71	25.79
2	32.03	33.04	29.72	31.04	31.06
3	35.03	35.60	32.72	34.14	34.07
4	32.79	33.05	30.92	32.12	32.11
5	27.27	27.88	25.67	26.24	26.37
6	28.30	29.10	27.02	27.96	27.76
7	26.78	26.78	25.10	26.34	25.73
8	22.72	23.31	21.13	23.25	22.13
9	23.35	23.64	21.62	24.54	22.66
10	24.38	24.91	22.89	24.51	24.79
11	22.12	23.72	20.89	23.37	22.20
12	19.92	20.33	19.23	21.79	18.31
13	24.34	24.54	23.64	26.33	24.81
14	38.50	-	38.14	-	37.38
15	38.97	39.20	38.03	-	37.38
16	40.19	40.64	39.07	39.30	39.64

* Amostras de surtos (tecidos/amostras coletadas com diagnóstico confirmado por isolamento viral) foram fornecidas pela Lanagro/PA.

3.4 Repetibilidade

Os testes de repetibilidade demonstraram que todos os métodos apresentaram valores semelhantes de repetibilidade, erros de medição e incertezas de medição (Tabela 4). Testes estatísticos comparando os valores de Ct confirmaram a reprodutibilidade dos métodos entre si. Apenas o FMDV.3D.130 apresentou os valores mais altos de incerteza de medição. O FMDV.3D.107 é o RT-qPCR recomendado pela OIE, então a repetibilidade de todos os outros métodos foi comparada com ele (Tabela 4). Todos os métodos apresentaram repetibilidade semelhante quando amostras com Ct abaixo de 33 foram utilizadas nos testes. As técnicas também exibiram eficiência semelhante na identificação de amostras negativas e positivas em ensaios interlaboratoriais. Mais uma vez, o FMDV.3D.130 não conseguiu amplificar amostras com valores de Ct mais altos. O FMDV.3D.99 consistentemente amplificou todas as amostras positivas com valores de Ct mais baixos em comparação com as outras técnicas (Tabela 5).

Tabela 4 Testes de repetibilidade para os cinco RT-qPCR e comparação da repetibilidade em relação ao FMDV.3D.107.

RT-qPCR	Repetibilidade	Erro de medida	Incerteza de medição	Repetibilidade vs FMDV.3D.107
FMDV.3D.107	0.72	1.34	0.33	-
FMDV.3D.88	0.85	1.40	0.44	0.69
FMDV.3D.99	0.43	1.37	0.28	0.57
FMDV.3D.130	1.06	2.01	0.49	0.93
FMDV.3D.183	0.61	1.42	0.38	0.66

Tabela 5 Ensaio interlaboratorial para avaliação dos RT-qPCRs testados neste estudo.

Amostra	FMDV.3D.107	FMDV.3D.88	FMDV.3D.99	FMDV.3D.130	FMDV.3D.183
1	18.79	18.20	16.45	20.21	17.71
2	19.28	20.67	16.67	20.09	18.87
3	20.76	21.20	19.27	22.96	20.25
4	26.56	26.90	24.19	28.32	26.88
5	36.98	37.50	34.02	39.39	36.53
6	36.41	36.88	34.92	36.56	36.06
7	39.47	-	38.87	-	45.08
8	-	-	38.94	-	40.50
9	-	-	37.43	-	-
10	-	-	-	-	-
11	40.52	-	38.90	-	-
12	37.76	38.53	36.13	37.86	38.74
13	-	-	-	-	-
14	-	42.00	-	-	42.00
15	-	-	-	-	-
16	27.29	27.94	26.01	26.69	26.01
17	27.06	27.55	25.77	27.27	26.16
18	-	-	-	-	-

4. Discussão

A RT-qPCR em uma etapa é um método recomendado pela OIE para detectar o FMDV. A técnica oferece vantagens como sensibilidade e um menor risco de contaminação, pois não requer eletroforese. Velocidade, capacidade de automação, sensibilidade, portabilidade e biossegurança estão entre os principais atributos do RT-qPCR, já que não há necessidade de amplificação viral (produção de material mais infeccioso, o que pode aumentar o risco de escape laboratorial). Além disso, é um método rápido e pode ser parcial ou totalmente automatizado, aumentando a velocidade de análise e o número de amostras processadas. Técnicas moleculares podem ser até mil vezes mais sensíveis do que o isolamento viral ⁽¹⁵⁾.

A implementação de um RT-qPCR em um laboratório deve ser abordada com cautela. Variações nos resultados podem surgir de fabricantes de reagentes ou equipamentos utilizados ⁽¹⁵⁾. Portanto, a verificação de desempenho e os testes de proficiência são necessários para garantir que o método esteja sendo replicado corretamente. Comparações entre PCRs já demonstraram que a repetibilidade pode ser baixa entre métodos ou entre laboratórios, portanto, há sempre o risco de que a PCR implementada rotineiramente não seja eficiente no diagnóstico ou não tenha sido adequadamente padronizada de acordo com a publicação ⁽¹⁶⁾.

Todos os métodos testados neste estudo visam a região 3D do FMDV, que é uma parte altamente conservada do genoma. Apesar de sua alta conservação, essa área genômica pode apresentar variações que podem ser relevantes no processo de diagnóstico⁽¹⁷⁾. Esse fato pode ser facilmente confirmado alinhando os oligonucleotídeos mencionados nas publicações com as sequências disponíveis no *GenBank*. Após o alinhamento, o FMDV.3D.99 foi

modificado incorporando primers que correspondem precisamente às regiões polimórficas identificadas na busca *in silico*. O FMDV.IRES.145, que visa a região IRES, também foi testado, mas devido à baixa eficiência, foi excluído de testes adicionais. Um dos fatores que podem ter afetado o desempenho desse último método pode ser o fato de que a região-alvo pode gerar estruturas secundárias que impedem o acesso efetivo dos *primers* durante a transcrição reversa ou amplificação⁽¹⁸⁾.

Os testes de especificidade revelaram a ocorrência de reações não específicas nas amostras utilizadas. Essas amplificações ocorreram em valores de Ct acima de 40 em amostras epiteliais de línguas bovinas. Os animais apresentaram sorologia e isolamento viral negativos. As amostras com amplificações não específicas diferiram entre as técnicas testadas. É importante observar que qualquer método pode fornecer resultados não específicos. Uma explicação plausível para as amplificações não específicas observadas nos testes de oligonucleotídeos direcionados para 3D é o emparelhamento potencial com regiões semelhantes no genoma do vírus da rinotraqueíte bovina (BRBV). Testes de especificidade *in silico* conduzidos usando o *software* Blast com todo o banco de dados do *GenBank* como alvo de alinhamento demonstraram que os *primers* e probes do FMDV.3D.107 exibem 94% a 100% de identidade com certas sequências do BRBV. O BRBV pode ser encontrado em amostras de *swabs* nasais ou traqueais e foi detectado em até 6,4% das amostras testadas nos Estados Unidos⁽¹⁹⁾. Como amostras de FMDV são frequentemente obtidas dessas regiões, seja através do epitélio ou na coleta de fluido esofágico faríngeo, a possibilidade de resultados falso-positivos aumenta, o que torna essencial que esses diagnósticos sejam analisados com mais cuidado.

Sensibilidade, ensaios interlaboratoriais e testes de repetibilidade foram essenciais para demonstrar que os métodos possuem eficiência semelhante na detecção do FMDV. No entanto, há pequenas diferenças, principalmente a falha consistente do FMDV.3D.130 em amplificar amostras com carga viral mais baixa. Essa falha requer atenção, uma vez que estágios muito precoces ou tardios da infecção estão associados a baixa eliminação viral e uma quantidade mínima de RNA viral detectável nas amostras⁽²⁰⁾. A integração de dados de campo (clínicos e epidemiológicos) deve ser combinada com a interpretação dos resultados.

Os testes realizados neste trabalho demonstram a importância de utilizar mais de um método de diagnóstico em caso de dúvidas ou resultados com Ct muito elevado, que podem ser casos de reações não específicas. A avaliação precisa ser constante, verificando se o método amplifica adequadamente as amostras circulantes no país e, em seguida, utiliza o RT-qPCR mais sensível para triagem. Variantes específicas de uma região podem ser importantes a ponto de exigir oligonucleotídeos específicos para vírus circulantes⁽²¹⁾.

No entanto, pode-se argumentar que alta sensibilidade pode não ser crucial para detectar um surto de FMDV. De acordo com publicações anteriores⁽²²⁾, quando um veterinário atende a um caso suspeito de doença vesicular, os sinais clínicos já estão avançados. O FMDV tem a característica de se espalhar rapidamente dentro de um rebanho não imune, resultando em muitos animais em diferentes estágios de infecção. Nessa perspectiva, um método mais específico teria maior importância.

5. Conclusão

Este estudo demonstrou a importância de avaliar métodos de diagnóstico antes de implementá-los em um laboratório. A realização de uma avaliação detalhada do método permite uma melhor compreensão de suas limitações e vantagens, contribuindo para uma interpretação precisa. Resultados não específicos representam um risco que requer uma avaliação cuidadosa. FMDV.3D.107 e FMDV.3D.99 parecem ser os mais recomendados para o diagnóstico do FMDV.

Conflitos de Interesse

Não existem conflitos de interesse a serem declarados.

Contribuição dos autores

Padronização das PCRs, Repetibilidade, Sensibilidade, Especificidade: Antonio Augusto Fonseca Junior

Isolamento viral: René Ribeiro da Silva

Extração dos ácidos nucleicos: Mateus Laguardia-Nascimento, Amanda Petrina Scotá Ferreira

Preparação do manuscrito: Marcelo Fernandes Camargos, Anselmo Vasconcelos Rivetti Júnior, Antonio Augusto Fonseca Junior

Referências

1. Alexandersen S, Zhang Z, Donaldson AI, Garland AJ. The pathogenesis and diagnosis of foot-and-mouth disease. *J Comp Pathol.* 2003 Jul;129(1):1-36. [https://doi.org/10.1016/s0021-9975\(03\)00041-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9975(03)00041-0)
2. Grubman MJ, Baxt B. Foot-and-mouth disease. *Clin Microbiol Rev.* 2004 Apr;17(2):465-93. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.2.465-493.2004>
3. Amaral TB, Gond V, Tran A (2016) Mapping the likelihood of foot-and-mouth disease introduction along the border between Brazil and Paraguay. *Pesquisa Agropecuária Brasileira.* 2016; 51(05):661-670. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2016000500029>
4. Davies G. The foot and mouth disease (FMD) epidemic in the United Kingdom 2001. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2002 Oct;25(5-6):331-43. [https://doi.org/10.1016/s0147-9571\(02\)00030-9](https://doi.org/10.1016/s0147-9571(02)00030-9)
5. Corbellini LG, Fernández F, Vitale E, Moreira Olmos C, Charbonnier P, Iriarte Barbosa MV, Riet-Correa F. Shifting to foot-and-mouth disease-free status without vaccination: Application of the PROMETHEE method to assist in the development of a foot-and-mouth national program in Uruguay. *Prev Vet Med.* 2020 Aug;181:105082. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105082>
6. OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Paris. 2018.
7. Callahan JD, Brown F, Osorio FA, Sur JH, Kramer E, Long GW, Lubroth J, Ellis SJ, Shoulars KS, Gaffney KL, Rock DL, Nelson WM. Use of a portable real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for rapid detection of foot-and-mouth disease virus. *J Am Vet Med Assoc.* 2002 Jun 1;220(11):1636-42. <https://doi.org/10.2460/javma.2002.220.1636>
8. Reid SM, Ferris NP, Hutchings GH, Zhang Z, Belsham GJ, Alexandersen S. Detection of all seven serotypes of foot-and-mouth disease virus by real-time, fluorogenic reverse transcription polymerase chain reaction assay. *J Virol Methods.* 2002 Aug;105(1):67-80. [https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(02\)00081-2](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(02)00081-2). PMID: 12176143
9. Oem JK, Kye SJ, Lee KN, Kim YJ, Park JY, Park JH, Joo YS, Song HJ. Development of a Lightcycler-based reverse transcription polymerase chain reaction for the detection of foot-and-mouth disease virus. *J Vet Sci.* 2005 Sep;6(3):207-12.
10. Dill V, Beer M, Hoffmann B. Simple, quick and cost-efficient: A universal RT-PCR and sequencing strategy for genomic characterisation of foot-and-mouth disease viruses. *J Virol Methods.* 2017 Aug;246:58-64. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.04.007>

11. Goris N, Vandenbussche F, Herr C, Villers J, Van der Stede Y, De Clercq K. Validation of two real-time RT-PCR methods for foot-and-mouth disease diagnosis: RNA-extraction, matrix effect, uncertainty of measurement and precision. *J Virol Methods*. 2009 Sep;160(1-2):157-62. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.05.005>
12. El Bagoury GF, Elhabashy R, Mahmoud AH, Hagag NM, El Zowalaty ME. Development and evaluation of one-step real-time RT-PCR assay for improved detection of foot-and-mouth disease virus serotypes circulating in Egypt. *J Virol Methods*. 2022 Aug;306:114525. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2022.114525>
13. Foglia EA, Lembo T, Kazwala R, Ekwem D, Shirima G, Grazioli S, Brocchi E, Pezzoni G. Combining Multiple Assays Improves Detection and Serotyping of Foot-and-Mouth Disease Virus. A Practical Example with Field Samples from East Africa. *Viruses*. 2021 Aug 10;13(8):1583. <https://doi.org/10.3390/v13081583>. PMID: 34452448; PMCID: PMC8412026.
14. Shi X, Liu X, Wang Q, Das A, Ma G, Xu L, Sun Q, Peddireddi L, Jia W, Liu Y, Anderson G, Bai J, Shi J. A multiplex real-time PCR panel assay for simultaneous detection and differentiation of 12 common swine viruses. *J Virol Methods*. 2016 Oct;236:258-265. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.08.005>
15. Moonen P, Boonstra J, van der Honing RH, Leendertse CB, Jacobs L, Dekker A. Validation of a LightCycler-based reverse transcription polymerase chain reaction for the detection of foot-and-mouth disease virus. *J Virol Methods*. 2003 Oct;113(1):35-41. [https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(03\)00220-9](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(03)00220-9)
16. Nérette P, Dohoo I, Hammell L, Gagné N, Barbash P, Maclean S, Yason C. Estimation of the repeatability and reproducibility of three diagnostic tests for infectious salmon anaemia virus. *J Fish Dis*. 2005 Feb;28(2):101-10. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2005.00613.x>. PMID: 15705155.
17. Moniwa M, Clavijo A, Li M, Collignon B, Kitching PR. Performance of a foot-and-mouth disease virus reverse transcription-polymerase chain reaction with amplification controls between three real-time instruments. *J Vet Diagn Invest*. 2007 Jan;19(1):9-20. <https://doi.org/10.1177/104063870701900103>
18. Nérette P, Dohoo I, Hammell L, Gagné N, Barbash P, Maclean S, Yason C. Estimation of the repeatability and reproducibility of three diagnostic tests for infectious salmon anaemia virus. *J Fish Dis*. 2005 Feb;28(2):101-10. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2005.00613.x>. PMID: 15705155.
19. Hause BM, Collin EA, Anderson J, Hesse RA, Anderson G. Bovine rhinitis viruses are common in U.S. cattle with bovine respiratory disease. *PLoS One*. 2015 Mar 19;10(3):e0121998. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121998>. PMID: 25789939; PMCID: PMC4366061.
20. El Bagoury GF, Elhabashy R, Mahmoud AH, Hagag NM, El Zowalaty ME. Development and evaluation of one-step real-time RT-PCR assay for improved detection of foot-and-mouth disease virus serotypes circulating in Egypt. *J Virol Methods*. 2022 Aug;306:114525. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2022.114525>. Epub 2022 Mar 23. PMID: 35337855.
21. Carrillo C, Tulman ER, Delhon G, Lu Z, Carreno A, Vagnozzi A, Kutish GF, Rock DL. Comparative genomics of foot-and-mouth disease virus. *J Virol*. 2005 May;79(10):6487-504. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.10.6487-6504.2005>
22. Stenfeldt C, Eschbaumer M, Rekant SI, Pacheco JM, Smoliga GR, Hartwig EJ, Rodriguez LL, Arzt J. The Foot-and-Mouth Disease Carrier State Divergence in Cattle. *J Virol*. 2016 Jun 24;90(14):6344-64. <https://doi.org/10.1128/JVI.00388-16>
23. Keck H, Hoffmann B, Eschbaumer M. Proof of Proficiency of Decentralized Foot-and-Mouth Disease Virus Diagnostics in Germany. *Viruses*. 2022 May 20;14(5):1098. <https://doi.org/10.3390/v14051098>
24. Shi X, Liu X, Wang Q, Das A, Ma G, Xu L, Sun Q, Peddireddi L, Jia W, Liu Y, Anderson G, Bai J, Shi J. A multiplex real-time PCR panel assay for simultaneous detection and differentiation of 12 common swine viruses. *J Virol Methods*. 2016 Oct;236:258-265. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.08.005>
25. Xu X, Yang F, Zhang Q, Xu Y, Huang J, Fu M, Zhang W. Development of a multiplex TaqMan qPCR assay for simultaneous detection and differentiation of four DNA and RNA viruses from clinical samples of sheep and goats. *J Virol Methods*. 2019 Apr;266:58-64. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.01.015>
26. Rasmussen TB, Uttenthal A, de Stricker K, Belák S, Storgaard T. Development of a novel quantitative real-time RT-PCR assay for the simultaneous detection of all serotypes of foot-and-mouth disease virus. *Arch Virol*. 2003 Oct;148(10):2005-21. <https://doi.org/10.1007/s00705-003-0145-2>

27. Wernike K, Hoffmann B, Beer M. Single-tube multiplexed molecular detection of endemic porcine viruses in combination with background screening for transboundary diseases. *J Clin Microbiol.* 2013 Mar;51(3):938-44. <https://doi.org/10.1128/JCM.02947-12>