

# **BOLETÍN**

**Del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa**

**Nº 64-67**



**ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD**

**Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la**

**ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD**

**ISSN 0009-0131**

---

**BOLETÍN  
del  
Centro Panamericano de Fiebre Aftosa**

---

*Nº 64-67, 1998-2001*

Boletín del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, n.1 – 1973 -

Río de Janeiro, 1973-n. ilust. 28cm.

1. Veterinaria – Periódicos. 2. Fiebre aftosa – Periódicos.  
I. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, ed.

# **Boletín 64-67**

## **DEL CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA**

### **CONTENIDO**

Considerações sobre biosegurança em arquitetura de biotérios.....	3
Telma Abdalla de Oliveira Cardoso	
[Abstract, Resumen, p. 17]	
Immunohistochemical recognition of a wide spectrum of lyssaviruses in formalin-fixed tissues by one monoclonal antibody .....	18
Jorge W. López, Charles V. Trimarchi, Alexander I. Wandeler, Yvonne van Gessel	
[Resumen, Resumo, p. 24]	
Vacinação emergencial de bovinos contra a febre aftosa .....	26
Gilfredo Comparsi Darsie, José Lourenço dos Reis, Alberto Knust Ramalho	
[Abstract, Resumen, p. 29]	
Uso de una proteína recombinante del virus de la fiebre aftosa, la polimerasa 3D, en una prueba de inmunodifusión en gel de agar .....	30
Use of a recombinant foot-and-mouth disease virus 3D polymerase in an agarose gel immunodiffusion test .....	35
Bergman Ingrid E., Malirat Viviana, Falcuk Abraham, Söndahl Magnus S.	
[Resumo, p. 39]	
<b>Resúmenes/Abstracts .....</b>	<b>40</b>
<b>Bibliografía sobre enfermedades vesiculares/ Bibliography on vesicular diseases .....</b>	<b>62</b>
<b>Instrucciones/Instructions .....</b>	<b>73</b>

## **RECONOCIMIENTOS**

El Editor responsable agradece la colaboración de los siguientes doctores en la revisión de los manuscritos:

Fernando Osorio

Ingrid Bergmann

Ivo Gomes

Juan Lubroth

Magnus S. Söndahl

Paulo Augé de Mello

Rossana Allende

T. Doel

## CONSIDERAÇÕES SOBRE A BIOSSEGURANÇA EM ARQUITETURA DE BIOTÉRIOS

Telma Abdalla de Oliveira Cardoso  
 Fundação Oswaldo Cruz  
 Av. Brasil 4036, sala 709, 22041-361, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

*Este trabalho visa a reflexão do desenvolvimento da pesquisa científica brasileira, relativa à programação arquitetônica de biotérios e de laboratórios de experimentação animal, tendo como premissa que o ambiente físico é um aspecto importante, que contribui para a confiabilidade e repetibilidade dos resultados experimentais.*

*Para a discussão das variáveis que caracterizam a ciência de animais de laboratório, a equipe multidisciplinar envolvida, necessita lançar mão de diretrizes para fundamentar o processo de planejamento das edificações.*

*A programação arquitetônica representa uma das formas de pensar da própria atividade de pesquisa, propondo-se a definir as condições adequadas, espacial e ambientalmente, para que o trabalho do pesquisador possa se desenvolver.*

A complexidade e diversidade das atividades do setor saúde vão desde o atendimento primário, que expõe o profissional a uma gama de agentes de risco por vezes desconhecidos, até sofisticados estudos com DNA recombinante, que colocam o profissional diante de uma tecnologia avançada de terapia genética, cuja dimensão de risco constitui em desafio a ser mensurado.

Além do enfrentamento com agentes patogênicos tradicionais, as doenças emergentes e reemergentes representam um problema

adicional para os profissionais de saúde sob dois aspectos. Primeiro, no que diz respeito à definição de mecanismos eficazes de contenção do processo epidêmico e, segundo, na identificação de medidas que assegurem o controle do risco ao qual estão sujeitos esses profissionais.

Biossegurança pode ser definida como sendo um conjunto de ações voltadas para a prevenção, minimização ou eliminação de riscos inerentes a estas atividades e que podem comprometer a saúde do homem, dos animais, do meio ambiente ou a qualidade dos trabalhos desenvolvidos. Neste contexto está inserida a atuação do médico veterinário, que é essencial

---

Solicitar separatas ao:  
 Centro Pan-Americano de Febre Aftosa (OPAS/OMS).

para o estabelecimento e manutenção das condições adequadas em uma unidade de criação ou de experimentação animal.

A classificação do nível de biossegurança, nos laboratórios de experimentação animal, é norteada por diversos fatores. Dentre eles destaca-se a patogenicidade do microrganismo infectante, virulência, via de inoculação, endemicidade, consequências epidemiológicas, disponibilidade de tratamento eficaz e de medidas profiláticas (2).

Em 1997, a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança estabeleceu a “Classificação de agentes etiológicos humanos e animais com base no risco apresentado”, em sua Instrução Normativa nº7 (1). Como forma de exemplificação, observa-se que: *Leishmania*, *Toxocara canis*, *Lepstopira interrogans*, *Clostridium botulinum* e o vírus rábico pertencem à classe de risco 2. *Brucella*, *Mycobacterium bovis*, vírus rábico urbano e vírus da Variola Símia pertencem à classe de risco 3. Os agentes da Febre Hemorrágica (Junin, Sabiá, Lassa e outros), vírus da Peste Suína, Vírus da Febre Aftosa e o vírus da Peste Equina Africana pertencem à classe de risco 4. Portanto, o tipo de projeto de edificação dos laboratórios de experimentação animal será determinado por esta classificação.

O presente trabalho visa contribuir com a equipe multidisciplinar envolvida no planejamento de um projeto arquitetônico, no momento em que discute a maioria das variáveis que caracterizam a ciência de animais de laboratório.

O desenho das instalações que compõem um biotério ou um laboratório de experimentação animal, constitui um dos fatores

de maior importância assegurando a eficácia de seu funcionamento e, consequentemente, o cuidado e a vigilância adequados à manutenção dos animais ali alojados.

Inicialmente, temos que estabelecer alguns conceitos relativos à organização e critérios de programação, objetivando subsidiar a elaboração e avaliação dos projetos. Discutiremos aspectos referentes à qualificação e quantificação dos animais de laboratórios, localização e edificação do biotério, dimensionamento interno, organização espacial e funcional, entre outros. A estruturação da área deve estar relacionada ao tipo de atividade a ser desenvolvida. A relação entre espaço e atividades são caracterizadas por requisitos ambientais, morfológicos e funcionais.

## **CARACTERIZAÇÃO DE BIOTÉRIOS**

Biotérios são instalações capazes de produzir e manter espécies animais destinadas a servir como reagentes biológicos em diversos tipos de ensaios controlados, para atender as necessidades dos programas de pesquisa, ensino, produção e controle de qualidade nas áreas biomédicas, ciências humanas e tecnológicas segundo a finalidade da instituição.

Cada situação é específica, devendo o projeto ser estabelecido em função do plano de produção ou de necessidades de utilização de animais.

Necessitamos estabelecer requisitos quanto à organização funcional, espacial e construtiva que permitam a criação ou a experimentação animal dentro de padrões de higiene, assepsia e segurança necessários à obtenção ou utilização de diferentes espécies animais segundo seu padrão sanitário. Os animais criados serão usados como

reativos biológicos. Portanto a sua pureza deverá ser fiscalizada ainda dentro do biotério, de forma a apresentar reações uniformes propiciando a repetibilidade e a reproduzibilidade de resultados experimentais.

Tanto os animais de criação, que serão utilizados como reativos, quanto os animais infectados requerem uma permanente vigilância ambiental, higiênica, profilática, epidemiológica, nutricional e genética. Isto demonstra, uma estrita disciplina operacional. Também significa que deverá haver uma contrapartida, em termos espaciais e construtivos, que responda a esta organização funcional.

### **TIPOS DE BIOTÉRIOS**

Um dos pontos a ser analisado para a instalação de um biotério é a localização, que está diretamente relacionada à sua finalidade. A localização deverá apresentar, certas características tais como, facilidade de estacionamento, local para carga e descarga de animais e suprimentos (18).

No biotério de experimentação, onde os animais ficarão alojados durante um determinado período experimental, a prática tem demonstrado a conveniência de que esta construção seja próxima à do laboratório de pesquisa. Ter-se-á, portanto, uma construção em torno da qual existam laboratórios. Assim, deverão ser previstos espaços para a instalação de barreiras sanitárias de proteção, tanto para o trabalhador quanto para o meio ambiente.

Preconiza-se a instalação do biotério de criação em áreas isoladas, distantes de centros urbanos, em locais onde possa ser mais facilmente evitada a introdução de fatores

ambientais desfavoráveis. Neste caso, é importante que sejam observadas as normas para o transporte dos animais.

### **CRITÉRIOS GERAIS DE PROGRAMAÇÃO**

A obtenção de determinadas informações a respeito das necessidades irão orientar o planejamento da edificação. Sugerimos que seja obedecido o seguinte roteiro demonstrativo: espécie animal; definição do padrão sanitário; densidade de ocupação animal; tipo de caixas e de estantes; tipo de separação por sala (espécie animal, tipo de ensaio ou nível de biossegurança); necessidade de isolamento; espaços auxiliares; definição do fluxograma das operações; tamanho da sala incluindo altura, largura e comprimento; arranjo interno dos espaços; informações a respeito da circulação ou tráfego, incluindo atividades operacionais tais como entrada de caixas, ração, saída do lixo, lavagem de materiais (caixas e bebedouros), quarentena, dentre outras; tipos de linhas de serviços (água, gases, energia e interfone); circulação vertical (escadas e elevadores) e rotas (rotas de acesso e de saída) (10).

### **IMPLANTAÇÃO DO BIOTÉRIO**

Os biotérios podem ser implantados de duas formas: pavilhonar ou em bloco único.

O sistema pavilhonar possui áreas destinadas aos animais independentes da área de controle de serviços. Nas áreas dos animais encontram-se os equipamentos mecânicos, bem como o depósito de ração e suprimentos. Nas áreas de serviço encontram-se a recepção dos suprimentos, escritórios e equipamentos para lavagem e desinfecção. Esta forma é bastante favorecida por limitar o acesso. Os animais são facilmente separados por espécie e por categoria, em edificações específicas, contendo anexos comuns. Além disto, a construção

pavilhonar facilita a expansão quando necessária. Porém, para este tipo de edificação, são elevados os custos de construção e de manutenção. Os espaços de apoio comuns deverão estar localizados centralmente em relação às áreas de produção a fim de que sejam facilitados os fluxos operacionais (figura 1).

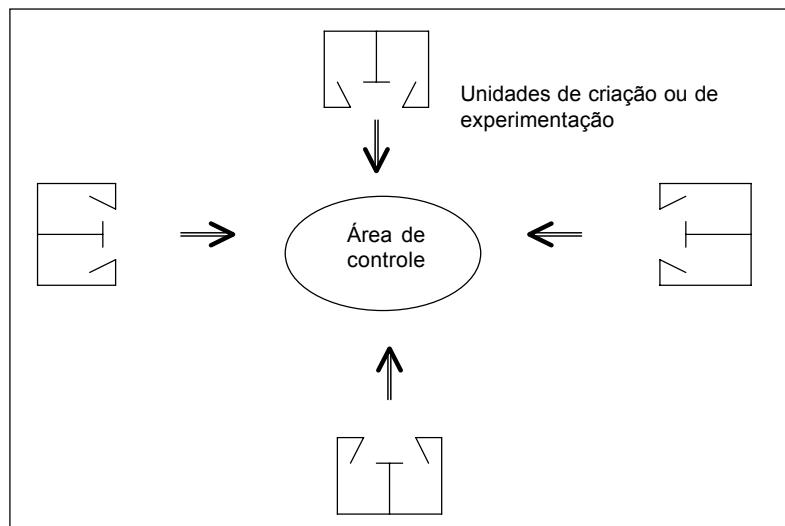
O sistema construção em bloco único está disposto num só piso, situado ao nível térreo, para facilitar o controle sanitário, as rotinas de trabalho, o acesso de pessoal, de suprimentos e a evacuação de lixo. Neste tipo de implantação os acessos ao biotério se dão através de barreiras. São independentes dos acessos às outras áreas ocupadas. Pode possuir um único corredor ou um sistema de dois corredores (figura 2).

No sistema mais simples, que constitui o biotério convencional, a circulação de pessoas, de material limpo, de lixo contaminado e de outros materiais, são feitos através de um único corredor, o que pode propiciar contaminação.

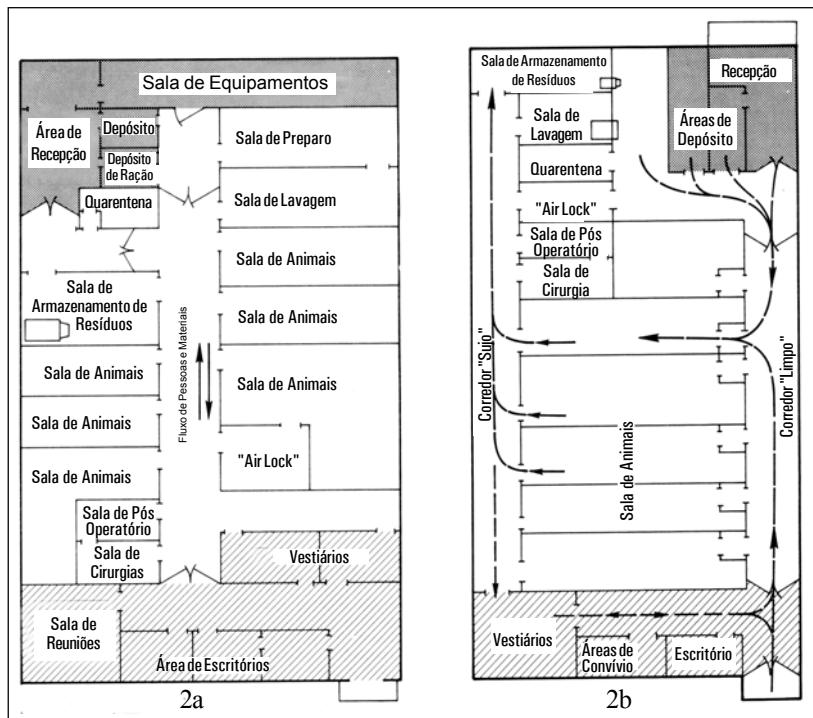
No segundo tipo o acesso e a saída das salas são separados, ou seja, passam a ocorrer por dois corredores independentes, havendo, portanto, maior nível de contenção. Este biotério possui melhor padrão sanitário porém requer maior área física. Temos dois corredores separados. O primeiro, denominado corredor de acesso (de distribuição ou corredor “limpo”), é destinado ao tráfego de pessoal técnico e de material a ser enviado às salas. O segundo, denominado corredor de retorno (ou corredor “contaminado” ou “sujo”) é destinado à saída de todos os materiais a serem encaminhados à esterilização, lavagem e incineração (figura 2b).

Com o intuito de aumentar a área laboratorial e de manutenção de animais, podemos obter biotérios de altos padrões sanitários com um só corredor se houver um controle rígido das boas práticas laboratoriais. Neste tipo de biotério teríamos a entrada e saída de materiais sendo feita através de autoclaves de porta dupla. (Figura 3).

Tanto para a forma pavilhonar quanto para a de bloco único, o biotério deverá ser



**FIGURA 1.**  
**Sistema pavilhonar de construção.**



**FIGURA 2. Biotério de corredor único e biotério com dois corredores (National Research Council).**

implantado em áreas dotadas de todos os tipos de serviços públicos necessários ao seu perfeito funcionamento (8).

Recomenda-se que a área total construída para instalação do biotério corresponda a, aproximadamente, 10% da área total da instituição à qual irá atender.

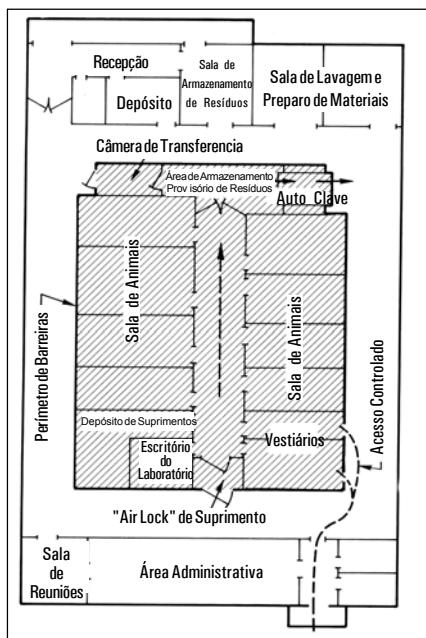
### **CONDIÇÕES AMBIENTAIS-ASPECTOS RELEVANTES**

Em termos de resposta biológica, todo experimento animal é a composição de efeitos genéticos e ambientais. Muitos fatores físicos, químicos e microbiológicos do ambiente, acrescidos aos fatores genéticos, podem, de alguma forma, influenciar a resposta do animal ao

estímulo experimental. Meio ambiente e espaços mal planejados podem propiciar situações dramáticas como a super-aglomeração que leva à asfixia ou ao canibalismo. O ambiente artificial transtorna, por vezes, aspectos comportamentais essenciais. Price, em 1976, observou tal transformação em espécies que praticam a territorialidade mas que, em cativeiro, passam a estabelecer hierarquias sociais, desde que os indivíduos menos fortes não têm como evitar os indivíduos dominantes (12).

#### **1. Temperatura e umidade**

Estas condições estão associadas aos níveis de metabolismo e comportamento animal. Para cada espécie animal existe uma faixa requerida de



**FIGURA 3. Planta para áreas de isolamento em biotérios (National Research Council).**

temperatura e umidade ambiental, na qual a temperatura corporal pode ser mantida constante através de mecanismos termorreguladores.

Para estabelecer as condições ambientais de temperatura e umidade deverá ser considerada a transferência de calor por irradiação do animal para o ambiente, a perda de calor livre ou forçado devido ao movimento do ar e a perda de calor por condução desde o corpo do animal aos materiais que entram em contato com ele. Além disto, para ajuste das condições térmicas, deverão ser considerados ainda aqueles fatores que foram impostos aos animais para fins de sua adaptação, tais como tamanho e material da gaiola, a presença ou ausência de material de cama, densidade populacional e outros.

## 2. Luminosidade

Na definição das condições ambientais de luz, deverão ser considerados a duração do fotoperíodo (horas/luz X horas/escuro), a intensidade expressa em Lux (lumens/m<sup>2</sup>) e o comprimento de onda, expressa em Angstrons. A luz visível estimula fotorreceptores e é responsável pela fotoperiodicidade que regula os ritmos circadianos, ciclos reprodutivos, atividade locomotora, consumo de água e alimentos, temperatura corpórea, toxicidade e efetividade de drogas, níveis séricos de lipídeos e de outros elementos.

O fotoperíodo deverá ser controlado. A luz é um fator sincronizador que origina o sistema circadiano, que é uma adaptação filogenética quase sincrônica com a rotação da Terra. A duração do fotoperíodo é um assunto ainda em discussão.

Temos ainda alguns fatores interferentes, tais como a localização das caixas nas estantes e o material usado na confecção das caixas, dentre outros. É um engano achar que a iluminação obtida através das janelas ou vidraças é natural. A luz obtida desta forma, apresenta um espectro mais vermelho, para o qual os animais de laboratórios são insensíveis, e menos violeta, que, além de elevar a carga térmica do recinto, aumenta o custo dos equipamentos de climatização (22).

## 3. Gradiente de pressão

O fluxo de ar de áreas sujas para áreas limpas deve ser banido e as pressões de ar deverão ser sempre maiores nas áreas limpas ou estéreis, nas quais é requerido menor contaminação ou maior assepsia. Já nas salas de experimentação animal as pressões de ar devem

ser sempre menores que nos corredores de acesso, para que seja evitada a contaminação ambiental por microrganismos patogênicos.

Os gradientes de pressão, além do diferencial de pressão, deverão também ser assegurados. Por exemplo: os gradientes de pressões em áreas estéreis ou limpas para as áreas sujas devem ser: depósito de suprimentos esterilizados e corredor limpo: tripla positiva; salas de animais devem possuir pressão dupla positiva; corredor sujo pressão positiva simples e o exterior pressão normal (21).

#### **4. Ruído**

O som é uma das variáveis mais importantes do meio ambiente em biotérios. Nestes ambientes os ruídos originam-se de diversos fatores, tais como vocalização de pessoas e dos próprios animais, operações de limpeza e de alimentação, funcionamento de equipamentos, bater de portas, dentre outros.

Avaliam-se os ruídos pela intensidade, que é medida em decibéis (dB) e, pela freqüência, que é medida em Hertz. As freqüências inaudíveis ao homem são chamadas de infra-som (baixas) (sons graves) e ultra-som (altas) (sons agudos).

A maioria dos animais, incluindo os animais de laboratório, ouvem sons de freqüências superiores àquelas audíveis pelo homem (13). Tanto o homem quanto os animais apresentam, dentro de suas faixas de freqüências de audição, as chamadas faixas de sensibilidade, ou seja, um ou mais intervalos de freqüência nos quais é maior a percepção da intensidade do som.

#### **CONSIDERAÇÕES SOBRE O MICRO-AMBIENTE**

A importância do controle ambiental, seja do macro-ambiente ou do micro-ambiente, se dá

naturalmente devido à necessidade de se padronizarem as condições físicas do animal, permitindo a realização de experimentos que possam ser repetidos a qualquer momento.

Micro-ambiente é o ambiente imediato da gaiola. Este ambiente é fundamental para o projeto e o planejamento de biotérios.

Os componentes mais importantes, a nível do micro-ambiente, são os materiais usados na confecção de gaiolas, o projeto da gaiola, a distribuição espacial das gaiolas e o material da cama.

As correntes convectivas, provocadas pelo calor dos animais, associadas ao número de animais por gaiola, de gaiola por estante e de gaiolas por sala, são fatores que poderão contribuir para a contaminação cruzada. O movimento de ar resultante em cada sala depende da interação entre as correntes de ar que se originam das gaiolas com animais, de outras fontes de calor (equipamentos, lâmpadas e janelas), de movimento, bem como do próprio sistema de insuflamento e de exaustão.

#### **RISCOS PROVENIENTES DO MANEJO DE ANIMAIS**

O manejo de animais oferece aos humanos, basicamente, dois tipos de risco: o de infecção e o traumático (por agressão), que muitas vezes poderá levar ao infeccioso.

Os animais podem excretar microrganismos nas fezes, urina, saliva ou aerolizá-los, originando, consequentemente, infecções. Existe ainda a possibilidade de inoculação de patógenos por mordeduras ou arranhaduras, assim como a transmissão direta, por contato com o animal, seu sangue ou tecidos coletados em necrópsias e autópsias, e indireta, por inalação

de poeira originada das gaiolas e camas dos animais (19).

Considerando, ainda, que animais infectados podem apresentar infecções subclínicas, não apresentando os sintomas da doença, todos os animais deverão ser considerados potencialmente infectados (11). Além disto é bom lembrar que, geralmente, as infecções naturais oferecem maior risco que as induzidas. Isto porque não são geralmente sintomáticas e não serão detectadas antes das primeiras manifestações (4).

## **NÍVEIS DE CONTENÇÃO FÍSICA**

Os níveis de contenção física estão relacionados aos requisitos de segurança para o manuseio de agentes infecciosos. São classificados em quatro classes de risco (20). Estes agentes estarão presentes naturalmente ou inoculados experimentalmente em animais nos biotérios de experimentação e irão estabelecer os níveis de biossegurança.

Laboratórios de experimentação animal de nível de biossegurança 1 são aqueles utilizados no ensino básico. Nestes não é necessário nenhum tipo de desenho especial além do atendimento às boas práticas laboratoriais e de um planejamento eficaz.

Os laboratórios de experimentação animal de nível de biossegurança 2 são aqueles que manipulam animais infectados com microrganismos da classe de risco 2. Nestes, o atendimento às boas práticas laboratoriais estão somadas alguns requisitos físicos de construção.

Os laboratórios níveis 1 e 2 são considerados laboratórios básicos de experimentação animal.

O laboratório de experimentação animal de contenção, nível de biossegurança 3, requer desenho e construção mais especializados que aqueles de níveis 1 e 2. Neste nível de biossegurança, os técnicos deverão receber treinamentos específicos quanto ao manuseio seguro destes microrganismos.

No laboratório de experimentação animal de contenção máxima, nível de biossegurança 4, as atividades estão diretamente relacionadas às atividades do laboratório de contenção máxima. Só deverão funcionar sob o controle direto das autoridades sanitárias e, devido ao alto grau de complexidade de atividades, recomenda-se a elaboração de manual de procedimento de trabalho pormenorizado devendo ser previamente testado por exercícios de treinamento.

## **BARREIRAS PRIMÁRIAS**

Barreira é um sistema que combina aspectos construtivos, equipamentos e métodos operacionais que buscam o controle das condições ambientais das áreas fechadas e a minimização das probabilidades de contaminações (20).

Se refere aos tipos de equipamentos utilizados dentro da sala para evitar a contaminação e a liberação de contaminantes biológicos, químicos ou radiológicos. São constituídas pelas caixas com sistemas de ventilação-exaustão próprios e pelas cabines de segurança biológica (14).

### **- Caixas ventiladas**

Estas caixas podem ser: caixas com filtros no topo, caixas de isolamento e cubículos para isolamento de caixas (figura 4).

### - Cabines de Segurança Biológica

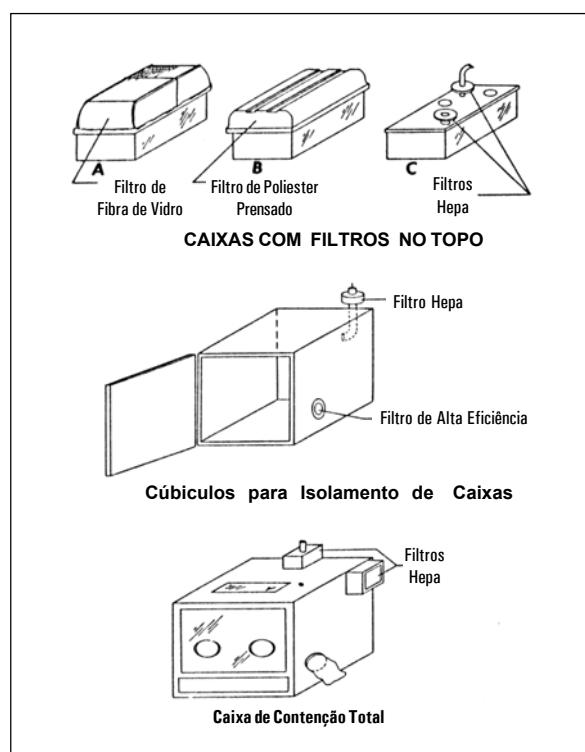
Estes tipos de equipamentos têm como objetivo principal conter quaisquer aerossóis gerados durante os ensaios com animais, tais como: necrópsias de animais infectados, manuseio de fluidos ou tecidos; ovos de animais infectados; inoculação intranasal de animais e manipulação de altas concentrações ou grandes volumes de material infeccioso.

Estes equipamentos devem ser ligados ao sistema de emergência no caso de falhas no fornecimento de energia (17). São eles (figura 5): cabine de segurança biológica classe I, classe II, classe II A, classe II B 1, classe II B 2, classe II B 3 e classe III. (22).

## EQUIPAMENTOS ESPECIAIS PARA CONTROLE DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL

### Sistema de contenção animal de ar limpo

Este é um sistema de contenção parcial (figura 6). Necessita de equipamentos de proteção individual para os técnicos. Previne a propagação de infecções entre os animais nos cubículos adjacentes. Minimiza tanto as infecções cruzadas dentro dos cubículos quanto a exposição dos animais aos contaminantes do ar da sala. Caixas convencionais são mantidas em cubículos com frente aberta, colocados verticalmente dos dois lados da sala. O ar insuflado passa por filtros absolutos (HEPA),

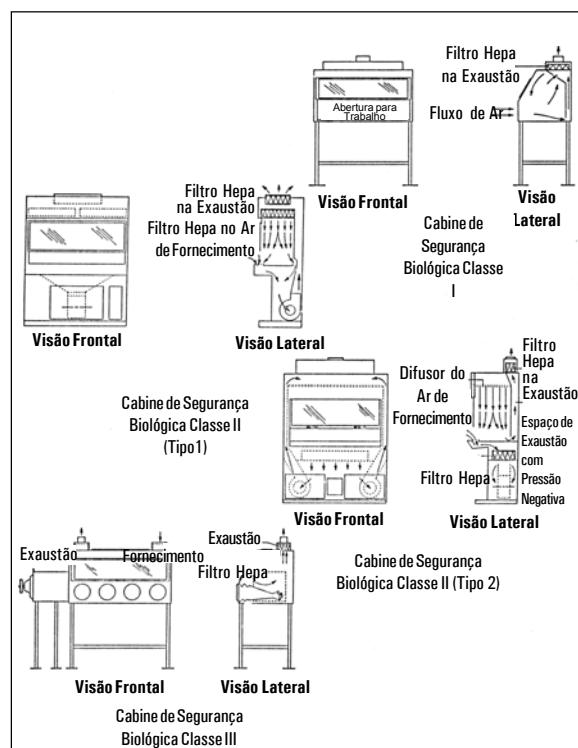


**FIGURA 4. Tipos de caixas (National Research Council).**

de cima para baixo, por entre as passagens dos cubículos, e é retirado de dentro das caixas sendo exaurido pela parte inferior dos cubículos. O ar é recirculado através de filtros HEPA (23).

#### - Autoclaves

Os métodos mais eficazes de esterilização de materiais oriundos dos laboratórios de experimentação animal são aqueles que utilizam a aplicação de calor úmido por pressão. Para a execução destas atividades são utilizadas três tipos de autoclaves: com deslocamento por gravidade, à vácuo e do tipo panela de pressão aquecida com combustível.

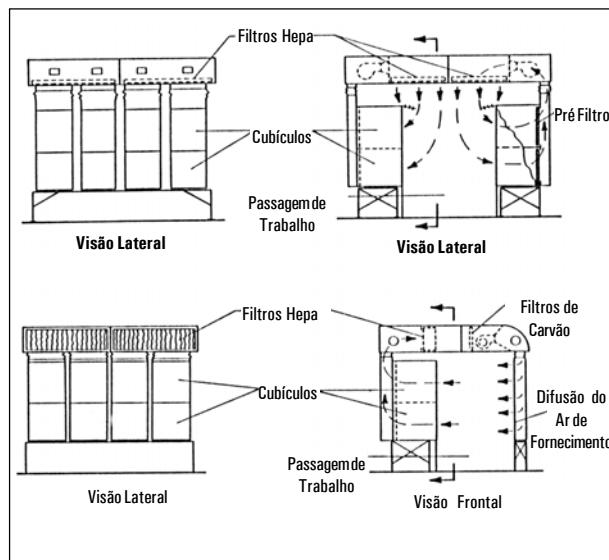


**FIGURA 5. Tipos de cabines de segurança biológica (National Research Council).**

#### - Incineradores

A incineração é um método útil para o descarte dos resíduos dos laboratórios de experimentação animal. Este processo só será indicado em substituição ao da autoclavagem nos casos de existência de um incinerador sob o controle do próprio laboratório e se houver a existência de câmara secundária de combustão (5). São desenhadas de forma a permitir ótima combustão e o mínimo de emissão de poluentes no ar. Os resíduos são incinerados na câmara primária, onde a temperatura atinge pelo menos 800º C. Os gases combustíveis e partículas que deixam a câmara primária são totalmente oxidados na câmara secundária por adição de calor onde a temperatura deve atingir no mínimo 1000º C. Os materiais que se destinam à incineração, mesmo após serem autoclavados, devem ser transportados até o incinerador, dentro de sacos plásticos fechados totalmente, de forma a não permitir o derramamento de seu conteúdo mesmo se virados para baixo. Os sacos contendo os resíduos deverão ser enviados dentro de um recipiente fechado e com tampa. As lixeiras para resíduos deste tipo deverão ser providas de tampas (3).

O tamanho do incinerador será determinado pelo tipo, volume, peso do resíduo e tempo gasto na operação de incineração. Além destes fatores sempre, no projeto deste equipamento, deverá ser lembrado que durante a vida útil do mesmo haverá mudanças ou decaimentos na capacidade de carga. Os incineradores podem produzir fumaça, gases, cinzas e odores. A cinza é um fator dependente do tipo de incinerador. O odor é um fator presente em todos os tipos.



**FIGURA6.** Sistema de contenção animal de ar limpo (National Research Council)

#### - Barreiras secundárias

São componentes de edificação que incluem: piso, paredes, teto, portas, air-locks, guichês de transferência, sistema de ar, dentre outros.

a) **Paredes** em alvenaria estrutural reforçada, com acabamentos sem juntas nem reentrâncias, com cantos arredondados, impermeáveis a líquidos e resistentes a desinfetantes químicos e gasosos.

b) **Pisos** antiderrapante, em resina epoxi, de alta resistência, com acabamento sem juntas, sem reentrâncias, com cantos arredondados, impermeável a líquidos e resistentes a desinfetantes químicos e gasosos.

c) **Tetos** em estrutura lisa, sem juntas e reentrâncias, com cantos arredondados e com acabamentos resistentes a desinfetantes químicos e gasosos.

d) **Portas** - confeccionadas em material retardante a fogo, a prova de insetos e roedores, nas dimensões de 1,00 X 2,00m (no mínimo) e, com dispositivo de abertura sem a utilização das mãos. Deverão possuir uma placa de proteção, com altura mínima de 0,40m em relação ao piso, para evitar fuga de roedores.

e) **Janelas** - não é recomendável a instalação de janelas com projeção ao exterior, pois podem alterar as condições climáticas.

#### - Sistemas de Barreiras

Suas principais variáveis são:

a) Entrada e saída de materiais feitos através de barreiras tipo câmaras pressurizadas (air-lock), autoclaves, tanques de imersão, guichês de transferências e outros.

O guichê de transferência é, normalmente, um túnel de dupla porta com abertura controlada e com sistema de desinfecção prévia por lâmpada ultravioleta, óxido de etileno ou qualquer outro desinfetante químico, que é utilizado enquanto os animais não o estão atravessando (7).

O tanque de imersão (dip-tank) é um tanque de passagem por imersão em que o animal passa devidamente acondicionado.

A câmara de transferência é um guichê mais sofisticado que apresenta adaptação para isoladores.

b) Entrada e/ou saída de técnicos através de vestiário com sistema de dupla porta, pressurizadas (air lock) e outros.

c) Sistema de condicionamento do meio ambiente, em especial o ar condicionado, quando obedecer a padrões pré estabelecidos tais como filtragem, não recirculação do ar, equilíbrio e outros.

## **CONCLUSÃO**

A atual era tecnológica, em que a interferência do homem no meio ambiente e o encurtamento das distâncias concorrem para o surgimento e agravamento do risco da introdução ou reincidência de doenças zoonóticas, alerta para a discussão das condições de biossegurança nas instituições de pesquisa, ensino, desenvolvimento tecnológico e prestação de serviços.

Em 1967 o mundo se espantou com o aparecimento de uma nova doença. Era trazida pelos macacos verdes importados para experiências de laboratório num instituto de pesquisa em Marburg, na Alemanha Ocidental. Sete seres humanos morreram, entre o pessoal do laboratório e as enfermeiras que trataram deles. Os macacos

trouxeram um vírus desconhecido da África Central (9).

A relevância do paradigma biotecnocientífico no mundo contemporâneo decorre do fato de que, a princípio, todos nós estamos envolvidos nos seus efeitos. Dentre eles podemos citar a fecundação *in vitro*; transferência de embriões; fármacos obtidos através das biotecnologias; modificações de plantas e animais pela manipulação e reprogramação dos seus genes; combate às grandes endemias e à fome, tratamento do câncer e da Aids, e até características meramente indesejáveis, dentre outras. Todas estas atividades envolvem uso de técnicas de biologia molecular, uso de novas terapêuticas que utilizam medicamentos ou células vivas de animais, manipulação de microrganismos e a produção de animais geneticamente definidos para diversos fins, que expõem o trabalhador de saúde a riscos de origem biológica, se constituindo, portanto em um dos maiores desafios atuais (15). Os animais utilizados nestas técnicas geralmente são imunocomprometidos e, por esta razão, devemos repensar os ensaios de alto risco e o desenvolvimento dos agentes infecciosos que são administrados aos animais. Uma publicação do ASM News em 1990, há o questionamento da replicação do HIV em camundongos SCID e as interações entre as viroses endógenas do animal e o vírus HIV que poderiam produzir pseudo tipos. Avaliam também, o risco da transmissão por aerossóis. Este tipo de transmissão amplifica o potencial de exposição em uma área de experimentação animal. Os pesquisadores aconselham, portanto, que se utilizem recomendações para laboratório de experimentação animal do nível 3 ao invés do laboratório de nível 2, neste tipo de modelo

animal (16). Isto exemplifica claramente que cada atividade de risco deve ser bem avaliada quanto às aplicações de biossegurança, e que poderá haver situações em que níveis de biossegurança maiores do que o recomendado sejam necessários, devido à natureza da atividade ou à proximidade do laboratório de experimentação com locais de riscos. Da mesma forma, um determinado nível de biossegurança poderá ser adaptado para compensar a ausência de determinadas práticas e recomendações. Os procedimentos de diagnóstico, envolvendo propagação de um agente para a identificação, tipagem ou teste de susceptibilidade, podem ser realizados em instalações de nível de biossegurança 2, desde que as práticas operativas recomendadas para o nível 3 sejam rigorosamente observadas. Por exemplo, no trabalho com vírus rábico, os procedimentos de rotina com tecidos ou fluidos de animais infectados podem ser realizados em instalações de nível de biossegurança 2, porém usando as práticas operativas de nível 3, enquanto os estudos de replicação viral e a manipulação de concentrados de vírus somente podem ser realizados em instalações e com práticas operativas para o nível 3.

A biossegurança é demonstrada mediante a determinação dos níveis de contenção física, de seus requisitos e da utilização de procedimentos de boas práticas laboratoriais, que são objetos da derivação dos julgamentos dos pesquisadores baseados no conhecimento atual e que têm por objetivo o desenvolvimento de um trabalho seguro (6). Ao determinarmos que os ensaios com animais são uma extensão da pesquisa laboratorial, os requisitos de qualidade e de controle das variáveis são os mesmos.

Profissionais com qualificação adequada e suportes laboratoriais adequados podem ocasionar uma queda acentuada nos custos da pesquisa. Os suportes laboratoriais são dependentes do projeto de edificação. Para a elaboração deste projeto há a necessidade de intercâmbio, contínuo e intenso, entre os pesquisadores e usuários com os engenheiros e arquitetos, especialmente na escolha de tipos de acabamento, finalização de linhas de serviço, níveis de iluminação, diferenciais de pressão, dentre outros detalhes evitando, assim, a disseminação ou a contaminação ambiental, infecções cruzadas e assegurando a saúde dos trabalhadores.

## REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Ciência e Tecnologia. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. Instrução Normativa nº 7. In: Cadernos de Biossegurança.Lex. Coletânea de Legislação. Brasília, DF; março 2000.
2. Boulter EA. Infectious hazards in safety in the animal house. Londres: Laboratory Animals Ltda; 1981.
3. Canadian Council on Animal Care. Guide to the care and use of experimental animals. Ontario: CCAC; 1984. 2 vol.
4. Cardoso TAO, Soares BEC, Oda LM. Biossegurança no manejo de animais em experimentação. Cad Téc Esc Vet UFMG 1997;(20):43-58.
5. Cardoso TAO. Resíduos em serviços de saúde. In: Oda LM, Ávila SM, orgs. Biossegurança em laboratórios de saúde pública. Rio de Janeiro,RJ: FIOCRUZ; 1998.
6. Centers for Disease Control. Laboratory safety. Atlanta, US: Dep. Health, Education and Welfare/Public Health Service; 1979. (HEW Publication,CDC79-818).

7. Centers for Disease Control. Working safely with research animals. In: Proceedings of the 4th National Symposium on Biosafety; 1996.
  8. Clough G. Environmental effects on animals used in biomedical research. *Biol Rev* 1982;57:487-523.
  9. Darlow HM. Safety in the animal house. *Lab Anim* 1967;1:35-42.
  10. Diaz J, González M, Cepero MA, Oliva R, Osa E, Yohanka T, Lazo L. Diseño y explotación de un laboratorio de ensayos biológicos. *Animales de experimentación. Rev Hispanoamericana* 1998; 4(2):18-24.
  11. Edward AG. Minimizing hazards to man in the laboratory animal facility. *J Am Vet Med Assoc* 1969; 155(12):2158-2159.
  12. Farias França MBP. Programação arquitetônica de biotérios. Brasília, DF: Ministério da Educação; 1986.
  13. Fletcher JL, McSheely T. Influence of noise on animals. In: *The Control of the animal house environment*. London: Laboratory Animals Ltd; 1976. pp. 51-62 (Laboratory animal handbooks, 7).
  14. Gamble MR, Clough G. Ammonia build-up in animal boxes and its effect on rat tracheal epithelium. *Lab Anim* 1976; 10:93-104.
  15. Guilbert J, org. Le sécurité dans les laboratoires de analyse des risques aux réglés d'exploitation. Paris: CNPP-AFNOR; 1993.
  16. Institut National de Santé et la Recherche Médicale. *Le risque biologique*. Paris: INSERM; 1991.
  17. Lima e Silva FHA. Barreiras de contenção. In: Oda LM, Ávila SM, orgs. *Biossegurança em laboratórios de saúde pública*. Rio de Janeiro, RJ: FIOCRUZ; 1998.
  18. Merusse JLB, Lapichick VBV. Instalações e equipamentos. In: *Manual para técnicos em bioterismo*. Brasília, DF: COBEA; 1996.
  19. Seamer JH, Wood M. *Handbooks 5: Safety in the animal house*. London: Laboratory Animals Ltda; 1981.
  20. Simas C. Biossegurança e arquitetura. In: *Biossegurança: uma abordagem multidisciplinar*. Rio de Janeiro, RJ: FIOCRUZ; 1996.
  21. Toru Urano KN, Guangcheng J, Tsukumi K. Survey of pseudomonas aeruginosa contamination in human beings and laboratory animals. *Exp Anim* 1995; 44(3): 233-239.
  22. Weihe WH. The effect of light on animals. In: *The Control of the animal house environment*. London: Laboratory Animals Ltd; 1976. pp. 63-67 (Laboratory animal handbooks, 7)
  23. World Health Organization. *Laboratory biosafety manual*. Geneve: WHO; 1995.
-

**ABSTRACT****Considerations on biosafety in architecture of laboratory animal housing.**

This work seeks the reflection of the development of the Brazilian scientific research, relative to the architectural programming of laboratory animal housing and of laboratories of animal experimentation, tends as premise that the design criteria is an important aspect, that contributes to the reliability of the experimental results. For the discussion of the variables that characterize the science of laboratory animals, the diversity team involved, needs to throw hand of guidelines to base the process of planning of the constructions. The architectural programming represents one in the ways of thinking of the own research activity, intending to define the appropriate, space and design conditions, so that the researcher's work can be developed.

**RESUMEN****Consideraciones a respecto de la bioseguridad en arquitectura de bioterios.**

Este trabajo busca la reflexión del desarrollo de la investigación científica brasileña, relativa a la programación arquitectónica de biotérios y de laboratorios de experimentación animal, tiene como premisa que la atmósfera física es un aspecto importante que contribuye a la confiabilidad y repetibilidad de los resultados experimentales. Para la discusión de las variables que caracterizan la ciencia de animales del laboratorio, el equipo multidisciplinario envuelto necesita usar diretrizes para basar el proceso de planificación de las construcciones. La programación arquitectónica representa una de las maneras de pensamiento de la propia actividad de la investigación y piensa definir las condiciones apropiadas, espaciales y ambientales, para que el trabajo del investigador pueda desarrollarse.

**IMMUNOHISTOCHEMICAL RECOGNITION OF A  
WIDE SPECTRUM OF LYSSAVIRUSES IN FORMALIN-FIXED TISSUES  
BY ONE MONOCLONAL ANTIBODY**

Jorge W. López<sup>4</sup>, Charles V. Trimarchi<sup>2</sup>, Alexander I. Wandeler<sup>3</sup>, Yvonne van Gessel<sup>1</sup>

<sup>1</sup>From Diagnostic Laboratory, Cornell College of Veterinary Medicine Ithaca, NY

<sup>2</sup>Rabies Laboratory, N.Y. State Department of Health, Albany, NY

<sup>3</sup>Rabies Unit, Animal Disease Research Institute, Nepean, ONT

<sup>4</sup>Present address Pan American Foot-and-Mouth Disease Center (PAHO/WHO)  
PO Box 589, 20001-970 Rio de Janeiro, Brasil

*Automated indirect immunoperoxidase (avidin-biotin complex) staining using monoclonal antibody #5DF12-3B6, directed against rabies N-protein, was used to detect rabies antigen in tissue samples from animals either naturally or experimentally infected with rabies. This monoclonal antibody recognized all 16 strains of rabies virus tested, as well as rabies-related lyssaviruses including Duvenhage, Lagos Bat, and Mokola. The sample infected with Mokola virus initially showed only weak staining, however, deletion of protease digestion resulted in stronger stain uptake. The test was sensitive and specific, correctly identifying rabies antigen in all but one of the samples tested (37/38), and no apparent staining in any of the negative samples tested (23/23). Tissues from 16 mammalian species were tested, including one rabies infected human tissue sample. The utility of the immunoperoxidase staining method described in this study lies in the ability of one monoclonal to recognize a broad spectrum of lyssaviruses in formalin-fixed tissues.*

Rabies is a highly fatal, zoonotic viral disease of worldwide concern. Several regional rabies eradication programs have been proposed. A reliable diagnostic test for rabies antigen that recognizes a wide variety of rabies virus variant, as well as rabies-related viruses, that can be

performed on formalin-fixed tissue, would be a useful screening tool for such a program. Formalin-fixation of tissues simplifies collection, storage and transport of samples, and eliminates hazards and need for biocontainment. It also facilitates retrospective studies specially if all tissues have already been fixed.

Rabies antigen has been detected in formalin-fixed tissue by both immunofluorescent

---

Reprint requests to:  
Pan American Foot-and-Mouth Disease (PAHO/WHO).

antibody test (IFA) (1,2,12-14) and immunoperoxidase staining (2-4, 9-11). However, the advantage of immunoperoxidase staining over IFA is that it allows for concurrent histopathologic examination of the tissue sections(2,13).

Both monoclonal (MAb) and polyclonal antibodies have been used successfully in immunohistochemistry to detect rabies antigen in formalin-fixed tissue. Immunoperoxidase staining using MAb has yielded better results than staining with polyclonal antibodies(8). One study tested a series of MAbs against a variety of rabies epitopes, and defined a panel that could recognize a wide spectrum of lyssaviruses using immunofluorescence(20). MAbs have also been used extensively to differentiate between lyssavirus variants of different serotypes (19,20), and have been a valuable tool in the epidemiologic study of rabies (16).

The primary purpose of this study was to document the recognition of a wide spectrum of rabies and rabies-related viruses by a single MAb using an automated avidin-biotin complex (ABC) immunoperoxidase staining procedure. This MAb has already been used to identify rabies antigen in infected tissue samples(4). The MAb used in this study, #5DF12-3B6, recognizes rabies protein N, which is a component of rabies ribonucleoprotein (RNP). The RNP is the most highly conserved portion of the virion among lyssavirus serotypes.

## MATERIALS AND METHODS

### Monoclonal antibody

The hybridoma 5DF12-3B6 was originally developed in 1984 at the Swiss Rabies Center in Bern, Switzerland, by fusing P3U1 myeloma

cells with spleen cells of a mouse immunized with nucleoprotein preparations of the SAD-Bern strain of rabies virus (H. Gerber, AI Wandeler, personal communication). Cloning and maintenance of hybridomas followed standard procedures(7). The MAb 5DF12-3B6 binds to N-protein of rabies viruses as documented by Western blotting and immunoprecipitation. In indirect IFA 5DF12-3B6 stains inclusion bodies in cells infected with lyssaviruses. The tissue culture supernatants used in the present investigations were produced on recloned 5DF12-3B6 hybridoma cultures grown in the Monoclonal Antibody Unit of Animal Disease Research Institute, Nepean, Canada.

### Tissue samples

To analyze the ability of the MAb to detect the viruses, a total of 60 brain tissue samples were examined for rabies antigen using ABC immunoperoxidase staining. Of these, 44 samples were from a variety of mammalian species that were obtained in different degrees of preservation, fixed in 10% formalin and saved by the New York State Department of Health, Albany, NY. One half of these samples (22 samples) were street rabies positive (21 mid-atlantic raccoon variant (MAR), and 1 Ontario red fox variant) by in vitro viral isolation using mouse neuroblastoma cell culture(15) and IFA(18); the other half were rabies negative. The MAR positive samples included tissues from dog, cat, raccoon, rabbit, beaver, and white tail deer, and 1 dog was positive for the Ontario red fox variant. The negative samples included the species mentioned above plus muskrat, guinea pig, opossum, goat, skunk, horse and cattle.

Fifteen samples were from mice experimentally infected at the New York State

Department of Health, Albany, NY with different strains of rabies virus or rabies-related lyssavirus. Infection was verified by IFA and virus isolation. One murine tissue sample was included as a rabies negative control. All samples were numbered and stained blindly.

In addition, brain tissue from mice inoculated with Duvenhage, Lagos bat and Mokola were kindly supplied by Dr. C. Rupprecht (Centers for Disease Control and Prevention, Rabies Unit, Atlanta, GA). Furthermore, human brain tissue infected with silver-haired bat virus was also stained.

### Immunohistochemistry

The ABC immunoperoxidase staining procedure was developed(8) and tested using known positive (4 horse and 2 bovine tissue samples) and negative formalin-fixed brain tissue samples obtained from the pathology files at Cornell University, Ithaca, NY. These samples were formalin-fixed and paraffin-embedded for up to 6 years. The rabies negative control tissues were from dog, horse and cattle infected with distemper, equine herpes virus 1 and bovine herpes virus 1 respectively.

ABC immunoperoxidase staining was performed with an automated slide stainer. Tissue sections of 4 um thickness were mounted on ProbeOn glass slides, and were deparaffinized using d-limonene and butylated hydroxanisole<sup>a</sup>. Endogenous peroxidases were inactivated with a solution of 0.5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in methanol for 12 minutes at room temperature. The sections were then digested with a solution of proteases<sup>b</sup> for 20 minutes at 42°C. Nonspecific protein adherence was blocked using 4% horse serum in PBS. The primary murine MAb was incubated for 55

minutes at 42°C. The secondary biotinylated horse anti-mouse antibody<sup>c</sup> was incubated for 22 minutes at 42°C. The avidin biotin peroxidase solution<sup>d</sup> was incubated for 35 minutes at 42°C and the chromogen, 3,3-diaminobenzidine-4HCl, for 5 minutes at 42°C. The sections were counterstained using Gills # 2 hematoxylin, dehydrated and coverslipped.

The staining procedure described above was repeated without protease digestion on all of the samples.

The sections were observed by light microscopy and samples were identified as negative in the absence of specific staining.

### RESULTS

ABC immunoperoxidase staining with MAb #5DF12-3B6 identified rabies antigen in neurologic tissue of 21 of the 22 naturally infected animals (Table 1). This staining procedure did not identify antigen in 1 sample taken from a raccoon that was infected with rabies MAR strain.

Brain tissue from 22 animals that were not infected with rabies and 1 rabies negative sample from an experimental mouse showed no apparent staining.

ABC immunoperoxidase staining was able to identify rabies antigen in a variety of different mammalian hosts. In all, tissue samples taken

---

#### Sources and manufacturers

<sup>a</sup>Hemo-de, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA.

<sup>b</sup>Pronase E, Sigma Chemical Co., St Louis, MO.

<sup>c</sup>Biotinylated horse anti-mouse antibody, Vector Laboratories, Burlingham, CA.

<sup>d</sup>VECTASTAIN Elite ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingham, CA.

from 15 different animal species and 1 human sample were examined for rabies antigen. The only misdiagnosed sample was one taken from a raccoon, which was the most frequently examined animal ( $n=18$ ). Misdiagnosis was unlikely due to species considerations.

The MAb was able to identify all the rabies strains that were tested (Table 2). All strains stained strongly with minimal nonspecific staining. Tissues infected with Lagos Bat and Duvenhage, 2 of the 3 rabies related viruses tested, showed strong, specific stain uptake as well. Tissue infected with Mokola rabies-related virus showed a weak staining reaction, however, deletion of protease treatment of the Mokola infected tissue sample resulted in much stronger stain uptake.

No cross reactivity was observed in tissues infected with distemper, equine herpes virus 1 and bovine herpes 1.

## DISCUSSION

This study has successfully demonstrated that automated ABC immunoperoxidase staining with MAb #5DF12-3B6 can recognize a wide spectrum of lyssavirus serotypes in formalin fixed paraffin embedded tissues. It is this wide spectrum recognition of lyssavirus serotypes, without cross reaction with other antigens, that makes this study noteworthy.

This staining procedure did not identify antigen in one sample taken from a raccoon that was infected with MAR strain. There was

**TABLE 1. ABC Immunoperoxidase staining of brain tissue from naturally infected animals**

Species	No. animals tested	Virus strain	IFA <sup>^</sup> positive	IHC <sup> </sup> positive
Dog	4	MAR*	2	2
Cat	6	MAR	3	3
Raccoon	18	MAR	12	11
Rabbit	3	MAR	1	1
Beaver	2	MAR	1	1
Whitetail deer	2	MAR	2	2
Dog	1	ORF#	1	1
Muskrat	1	-	0	0
Cattle	2	-	0	0
Goat	1	-	0	0
Horse	1	-	0	0
Guinea pig	1	-	0	0
Opossum	1	-	0	0
Skunk	1	-	0	0
Total	44		22	21

\* MAR - Mid-Atlantic Raccoon.

# ORF - Ontario Red Fox.

<sup>^</sup> IFA - Immunofluorescent antibody test.

| IHC - ABC Immunoperoxidase staining

**TABLE 2. ABC Immunoperoxidase staining of brain tissue from mice experimentally infected with different strains of rabies virus**

Virus strain	Immunofluorescent antibody test	Immunoperoxidase
Ontario red fox	+	+
Mexican dog	+	+
Oklahoma skunk	+	+
ERA	+	+
Silver-haired bat	+	+
Denmark bat	+	+
Hoary bat	+	+
Eptesicus bat I	+	+
Eptesicus bat II	+	+
Vampire bat	+	+
Myotis bat	+	+
Holland bat	+	+
Red bat	+	+
Poland raccoon dog	+	+
Mexican freetail bat	+	+

nothing unusual about the host or the strain of rabies virus. This failure of recognition is most likely due to the minimal antigen content of the sample, as it was only weakly IFA positive, and the tissue sample itself was exceptionally small.

There are 6 lyssavirus serotypes: (1) Rabies, (2) Duvenhage, (3) Mokola, (4) Lagos Bat, (5) kotonkan, and (6) Obodhiah. The first three produce clinical disease in man, and the last two are arthropod-borne. Only rabies has been recognized as having worldwide distribution. It was previously believed that the rabies-related viruses were restricted to shrews and mice of sub-Saharan Africa. However, atypical rabies virus similar to Mokola virus were isolated from cats and a dog in Zimbabwe(5), and the recent realization that a “Duvenhage-like” virus is present in bats in Europe, may pose a question regarding past rabies diagnostic screening procedures(17). This illustrates the importance

for stringent screening for rabies-related viruses in all rabies diagnostics, control programs, or epidemiology studies, regardless of their location.

The weak stain uptake of tissue heavily infected with Mokola virus in this study is of concern, although deletion of protease digestion did improve stain uptake. Most rabies strains are so antigenically similar that it is difficult to distinguish one from another. However, there is significant antigenic variation between rabies and rabies-related viruses. The arbo lyssaviruses show only a distant antigenic relationship to rabies, whereas, the other three rabies-related viruses are antigenically similar to rabies virus(17). Of these three, only Mokola virus shares common determinants with the arbo lyssaviruses(6) making it a genetic-link between rabies virus and the arbo lyssaviruses. However, this also suggests that of the similar lyssaviruses, rabies, Mokola, Duvenhage, and Lagos Bat, Mokola is the most antigenically

distinct. This might account for the weak reaction of the Mab tested in tissue containing abundant Mokola virus antigen.

In addition to the wide spectrum of lyssavirus recognition, the MAb ABC immunoperoxidase test described in this study has several other advantages over previously described rabies diagnostic tests. Previously immunoperoxidase staining has been time consuming, and the number of samples processed per day was limited to approximately 50 slides per day(8). Using an automated slide stainer has greatly alleviated this restraint. The machine used in this study can stain 60 slides using a 3 1/2 hour protocol. In addition, automation decreases the amount of variability between slides by keeping constant all variables, including temperature, reagent amounts and incubation times.

Immunoperoxidase staining was performed on formalin-fixed tissue. In many cases it is not practical to transport fresh or frozen tissue to the appropriate laboratory facility for IFA staining or viral isolation. Fixing tissues in formalin is easily done, as it requires no special preparations or technical skills. In addition, fixing tissue in formalin reduces the risk of human exposure. Furthermore, the ability to detect rabies antigen in formalin-fixed tissues allows for retrospective studies, as well as diagnostic use.

## REFERENCES

- Barnard BJH, Voges SF. A simple technique for the rapid diagnosis of rabies in formalin-preserved brain. Onderstepoort J Vet Res 1982;49:193-194.
- Bourgon AR, Charlton KM. The demonstration of rabies antigen in paraffin-embedded tissues using the peroxidase-antiperoxidase method: a comparative study. Can J Vet Res 1987;51:117-120.
- Feiden W, Kaiser E, Gerhard L et al. Immunohistochemical staining of rabies virus antigen with monoclonal and polyclonal antibodies in paraffin tissue sections. J Vet Med B 1988;35:247-255.
- Fekadu M, Greer PW, Chandler FW, Sanderlin DW. Use of the avidin-biotin peroxidase system to detect rabies antigen in formalin-fixed paraffin-embedded tissues. J Virol Methods 1988;19:91-96.
- Foggin CM. Atypical rabies in cats and a dog in Zimbabwe. Vet Rec 1982;110:338.
- Frazier CL, Shope RE. Serologic relationships of animal rhabdoviruses. In: Bishop L, ed. Rhabdoviruses. Boca Raton, FA: CRC Press. 1979. vol I, pp. 44.
- Goding JW. Monoclonal antibodies: principles and practice. London: Academic Press; 1983.
- Haines DM, Chelack BJ. Technical considerations for developing enzyme immunohistochemical staining procedures on formalin-fixed paraffin embedded tissues for diagnostic pathology. J Vet Diagn Invest 1991;3:101-112.
- Hamir AN, Moser G. Immunoperoxidase test for rabies: utility as a diagnostic test. J Vet Diagn Invest 1994;6:148-152.
- Hamir AN, Moser G, Rupprecht CE. A five year (1985-1989) retrospective study of equine neurological diseases with special reference to rabies. J Comp Path 1992; 106:411-421.
- Hamir AN, Moser G, Rupprecht CE. Morphologic and immunoperoxidase study of neurologic lesions in naturally acquired rabies of raccoons. J Vet Diagn Invest 1992; 4:369-373.
- Johnson KP, Swoveland PT, Emmons RW. Diagnosis of rabies by immunofluorescence in trypsin-treated histologic sections. J Am Med Assoc 1980;244:41-43.
- Palmer PG, Ossent P, Suter MM, Ferrari E. Demonstration of rabies antigen in paraffin tissue sections: complications of the immunofluorescence technique with the unlabeled antibody enzyme method. Am J Vet Res 1985;46:283-286.
- Reid FL, Hall NH, Smith JS, Baer GM. Increased immunofluorescent staining in rabies-infected, formalin-fixed brain tissue after pepsin and trypsin digestion. J Clin Microbiol 1983;18:968-971.
- Rudd, RJ, Trimarchi, CV. Development and evaluation of an *in vitro* virus isolation procedure as a replacement for the mouse inoculation test in rabies diagnosis. J Clin Microbiol 1989;27(11):2522-2588.

16. Rupprecht CE, Glickman LY, Spencer PA, Wiktor TJ. Epidemiology of rabies virus variants. Am J Epidemiol 1987; 126:298-309.
  17. Rupprecht CE, Dietzschold B, Wunner WH, Koprowski H. Antigenic relationships of Lyssaviruses. In: Baer GM, ed. The natural history of rabies. 2.<sup>a</sup> ed. Boca Raton, FL: CRC Press; 1981. pp. 69-100.
  18. Trimarchi CV, Debbie JG. The FAT in rabies. In: Baer GM, ed. The natural history of rabies. 2.<sup>a</sup> ed. Boca Raton, FL: CRC Press; 1991. chapter 11.
  19. Schneider LG, Dietzschold B, Dierks RE, Matthaeus W, Jenzman P, Strohmaier K. Rabies group-specific ribonucleoprotein antigen and a test system for grouping and typing of rhabdoviruses. J Virol 1973; 11:748-755.
  20. Wiktor TJ, Flamand A, Koprowski H. Use of monoclonal antibodies in diagnosis of rabies virus infection and differentiation of rabies and rabies-related viruses. J Virol Methods 1980; 1:33-46.
- 

## RESUMEN

**El reconocimiento inmunohistoquímico de un amplio espectro de lyssaviruses en tejidos fijados en formalina por un anticuerpo monoclonal.**

Una tinción de inmunoperoxidasa indirecta (complejo avidina-biotina) usando el anticuerpo monoclonal 5DF12-3B6, que reconoce la proteína N del virus de la rabia, se usó para detectar antígeno del virus de la rabia en muestras de tejido de 15 especies animales y una muestra humana infectadas con rabia naturalmente o experimentalmente. Este anticuerpo monoclonal reconoció todas las 16 cepas de virus de la rabia que se usaron en este estudio, como también lyssavirus relacionados a rabia

como Duvenhage, Lagos Bat y Mokola. La muestra infectada con Mokola inicialmente sólo demostró una tinción débil, la que se hizo más fuerte cuando se eliminó el tratamiento con Pronase E. La tinción es sensible y específica, identificando correctamente el antígeno de rabia en todas las muestras usadas con excepción de una muestra (37/38) que era débilmente positiva por IFA y muy pequeña. Además no se detectó tinción específica en las muestras negativas (23/23). La utilidad del método de tinción de inmunohistoquímica descrito se basa en la habilidad de un anticuerpo monoclonal para reconocer un amplio espectro de lyssavirus en tejidos fijados en formalina.

## RESUMO

### O reconhecimento imunohistoquímico de um amplo espectro de lyssaviruses em tecidos fixados em formalina por um anticorpo monoclonal.

Uma tinção de imunoperoxidasa indireta (complexo avidina-biotina) usando o anticorpo monoclonal 5DF12-3B6, que reconhece a proteína N do vírus da raiva, se usou para detectar antígeno do vírus da raiva em amostras de tecido de 15 espécies animais e uma amostra humana infectadas com raiva naturalmente ou experimentalmente. Este anticorpo monoclonal reconheceu todas as 16 cepas do vírus da raiva que foram usadas em este estudo, como também lyssavirus relacionados

à raiva como Duvenhage, Lagos Bat e Mokola. A amostra infetada com Mokola demonstrou inicialmente uma tinção que ficou mais forte quando se eliminou o tratamento com Pronase E. A tinção é sensível e específica, identificando corretamente o antígeno de raiva em todas as amostras usadas, com exceção de uma amostra (37/38) que era debilmente positiva por IFA e muito pequena. Contudo não se detectou tinção específica nas amostras negativas (23/23). A utilidade do método de tinção de imunohistoquímica descrito se baseia na habilidade de um anticorpo monoclonal para reconhecer um amplo espectro de lyssavirus em tecidos fixados em formalina.

**Comunicação breve**

## VACINAÇÃO EMERGENCIAL DE BOVINOS CONTRA A FEBRE AFTOSA

Gilfredo Comparsi Darsie, José Lourenço dos Reis, Alberto Knust Ramalho  
 Centro Pan-Americano de Febre Aftosa/OPAS/OMS  
 Caixa Postal 589 20001-970 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

*Experimentou-se a utilização de uma vacina monovalente formulada com antígeno da cepa O1 Campos e saponina como adjuvante, para vacinação emergencial de bovinos em áreas livres de febre aftosa. Os resultados obtidos demonstram vários aspectos favoráveis à sua recomendação.*

A vacinação emergencial de espécies susceptíveis, econômica e epidemiologicamente importantes, em áreas livres de febre aftosa em que ocorra a introdução acidental do agente, é uma decisão que requer a avaliação criteriosa de suas consequências. A existência de anticorpos na população vacinada, em períodos variáveis de tempo após a situação de emergência, dificulta e retarda a nova certificação do status de livre sem vacinação.

A vacina ideal para utilização nestas condições seria aquela que induzisse uma rápida formação de anticorpos contra a cepa viral ocorrente, apresentasse baixo custo, facilidade de aplicação e curto período de detecção de anticorpos pós-vacinais.

---

Solicitar separatas ao:  
 Centro Pan-Americano de Febre Aftosa (OPAS/OMS).

Com este objetivo, experimentou-se a utilização de uma vacina monovalente formulada com a cepa O1 Campos contendo 14,8 $\mu$ g de partículas 14OS e 5mg de saponina por dose de 3ml, inoculada por via subcutânea. Foram vacinados 30 bovinos da raça Nelore com 9 meses de idade sem anticorpos contra a febre aftosa. Os animais foram mantidos em regime de pastoreio natural.

Aos 7 e 14 dias pós-vacinação (DPV), foram tomadas amostras de sangue para obtenção de soro a ser utilizado na avaliação do nível de anticorpos circulantes induzidos pela primovacinação. Os resultados são apresentados no Quadro 1, representando a média das Expectativas Percentuais de Proteção (EPP) (3) com base nos títulos individuais de anticorpos determinados pela prova ELISA-CFL (4). Todos os soros foram VIAA (1) negativos.

Aos 14DPV, os animais foram divididos aleatoriamente em 2 grupos de 15 bovinos e revacinados. O Grupo A recebeu a mesma vacina utilizada na primovacinação. O Grupo B foi revacinado com vacina oleosa monovalente de emulsão primária contendo 5,5 $\mu$ g de partículas 140S por dose de 3ml inoculada por via intramuscular.

Aos 7, 42, 84 e 140 dias pós-revacinação (DPR) foram tomadas amostras de sangue para obtenção de soro para avaliação de EPP (Quadro 1), determinação de VIAA e reactividade à proteínas não estruturais por EITB (2). No grupo A (vacinação e revacinação com antígeno + saponina) 14 soros apresentaram reactividades na prova VIAA a 7 e 42DPR sendo negativos após este período. Destes, somente 2 soros apresentaram reactividade a EITB pelo mesmo período. Todos os soros VIAA negativos foram também EITB negativos.

## CONCLUSÕES

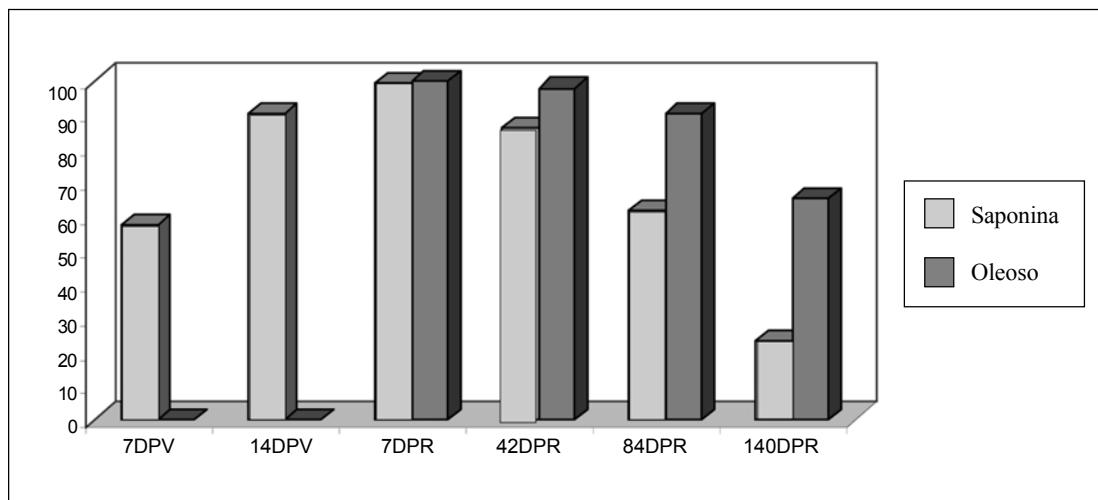
Os resultados obtidos com uma vacina emergencial como a experimentada, demonstraram vários aspectos favoráveis à sua utilização. A nível de produção não é difícil a obtenção de suspensões com massa antigênica de 4-5 $\mu$ g de 140S/ml, o que permite formular vacinas com alto conteúdo antigênico, sem necessidade de concentração. Isso reduz custos e permite rápida produção de grandes quantitativos de doses em pouco tempo. Esse é um fator de grande importância no caso de introdução em áreas livres de cepas não existentes nos bancos de vacina. A utilização da saponina como adjuvante em vacinas antiaftosa é conhecida e aceita como eficaz, sendo de baixo custo e fácil manipulação. A resposta imunológica observada é compatível com a esperada. Como o antígeno é apresentado ao sistema imunológico em uma

**QUADRO 1.** Expectativa percentual de proteção de vacinas emergenciais

	Adjuvante	
	Saponina EPP	Oleoso EPP
7 DPV	57,57	-
14 DPV	90,35	-
7 DPR	99,07	99,58
42 DPR	86,39	97,78
84 DPR	61,60	90,39
140 DPR	23,51	65,14

forma direta e em quantidades elevadas, a resposta primária é rápida e eficiente, proporcionando uma EPP média aceitável aos 7DPV e excelente aos 14DPV. É esperado que com ações de controle de focos e com esses níveis de EPP, um evento emergencial seja de curso rápido e perfeitamente controlado. Caso seja julgado necessário um período de proteção vacinal prolongado, a revacinação com vacinas com adjuvante oleoso ou saponina deve ser

longos períodos. Isso faz recomendar que a vacinação seja feita com antígeno + saponina e que os animais sejam descartados do rebanho através de abate sanitário programado, levando à expressiva redução dos custos de indenizações. Com essa prática também serão eliminados todos os possíveis reacionantes às provas VIAA e EITB, por anticorpos induzidos por抗ígenos existentes em vacinas não purificadas.



**FIGURA 1.** Expectativa percentual de proteção de vacinas emergenciais.

avaliada. A decisão de revacinar com antígeno + saponina levará à índices aceitáveis por 84DPR enquanto a revacinação com vacina com adjuvante oleoso proporcionará altos índices por no mínimo 140DPR (Figura 1). Em se tratando de áreas livres, não é aceita a existência de animais com anticorpos circulantes, não sendo portanto conveniente a manutenção de altos níveis de proteção por

O presente experimento teve seguimento com vacinas formuladas com outros adjuvantes oleosos e diferentes esquemas de vacinação com resultados que serão apresentados em outra publicação.

## REFERÊNCIAS

1. Alonso A, Söndahl MS. Preparación y concentración de los antígenos 140 S, 12 S y

- VIA del virus de la fiebre aftosa. Bol Cent Panamerican Fiebre Aftosa 1975; (17-18): 1-8.
2. Bergmann IE, Augé de Mello P, Nietzert E, Beck E, Gomes I. Diagnosis of persistent aphthovirus infection and its differentiation from vaccination response in cattle by use of enzyme-linked immunoelctrotransfer blot analysis with bioengineered nonstructural viral antigens. Am J Vet Res 1993; 54 (6): 825-831.
  3. Gomes I, Astudillo V. Foot-and-mouth disease: evaluation of mouse protection test
- 
- results in relation to cattle immunity. Bol Cent Panamerican Fiebre Aftosa 1975; (17-18): 9-16.
4. Subproyecto para la correlación de las técnicas de control de potencia de las vacunas contra la fiebre aftosa en los países de la Cuenca del Río de la Plata. Cooperación de la Comunidad Económica Europea con Argentina, Brasil y Uruguay a través del Cent Panamerican Fiebre Aftosa/Organización Panamericana de la Salud. Rio de Janeiro, 1989.

## **ABSTRACT**

**Emergency vaccination  
for foot-and-mouth disease in cattle.**

The use of a monovalent vaccine containing strain O1 Campos antigen with the adjuvant saponin was tested for emergency use in areas free of foot-and-mouth disease. Certain favorable results support its use.

## **RESUMEN**

**Vacunación emergencial de bovinos contra la fiebre aftosa.**

Fue probada la utilización de una vacuna monovalente formulada con antígeno de la cepa O1 Campos y saponina como adyuvante, para vacunación emergencial de bovinos en áreas libres de fiebre aftosa. Los resultados obtenidos demuestran varios aspectos favorables a su recomendación.

**Comunicación breve**

**USO DE UNA PROTEÍNA RECOMBINANTE DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA, LA POLIMERASA 3D, EN UNA PRUEBA DE INMUNODIFUSIÓN EN GEL DE AGAR**

Bergmann Ingrid E.<sup>1</sup>, Malirat Viviana<sup>1</sup>, Falczuk Abraham<sup>2</sup>, Sondahl Magnus S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS)

Caixa Postal 589 20001-970 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>2</sup>Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA)

Av. Fleming 1653, Martínez, Buenos Aires, Argentina

*En este estudio, se examinó la efectividad del uso del polipéptido 3D recombinante, obtenido en su forma nativa en una prueba de IDGA (IDGA-3D), para uso en la detección de anticuerpos específicos de infección con VFA, independientemente de la condición de vacunación. Los resultados indican que en relación a la tradicional prueba de IDGA-VIAA, la IDGA 3D ofrece, particularmente cuando se evalúan sueros de bajo título, un método más consistente, con especificidad comparable, y por lo menos la misma sensibilidad. Ninguno de los antígenos ofreció una ventaja particular con respecto a la definición de las bandas de precipitación. El reemplazo del VIAA por la proteína 3D recombinante tiene considerables atracciones, dado que proporciona un suministro ilimitado de material inocuo, económico, de fácil purificación y consistente, eliminando la presencia potencial de antígenos no específicos de células BHK o componentes de la cápside del VFA.*

El término “antígeno asociado a la infección viral” (VIAA) para el virus de la fiebre aftosa (VFA) se refiere convencionalmente a un complejo de proteínas no-estructurales identificado por Cowan y Graves (5), cuyo principal componente es la ARN polimerasa viral, proteína 3D (13).

---

Solicitar separatas al::  
Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS).

La primera técnica descripta para la detección de anticuerpos anti-VIAA como indicio de infección previa con el VFA fue la prueba de inmunodifusión en gel de agar (IDGA) (8). Debido a la baja sensibilidad de este test, Alonso y colaboradores (3), desarrollaron un ensayo inmunoenzimático de ELISA en fase líquida (ELISA-VIAA) para identificar y cuantificar los anticuerpos contra el VIAA del VFA. Sin embargo, la mayor sensibilidad alcanzada mediante la aplicación de este tipo

de ensayo, en comparación con el IDGA-VIAA, generó un aumento en el número de resultados VIAA-positivos en ganado vacunado y reinmunizado con vacunas que contienen altas concentraciones de antígenos no purificados del VFA. Asimismo, la limitada reproducibilidad observada en las pruebas de VIAA (6), (I. Bergmann y colaboradores, comunicación personal) parece ser una propiedad inherente a la naturaleza semi-purificada de las preparaciones de VIAA, que están sujetas a variación en la calidad del antígeno entre los diferentes lotes. Además, la producción del antígeno convencional VIAA-VFA se realiza por purificación parcial a partir de suspensiones del virus producidas en cultivo de células de riñón de hamster jóvenes (BHK), para lo cual se requiere una unidad de laboratorio de alta seguridad, para el manejo del VFA (1,9).

Para superar las limitaciones mencionadas, el reemplazo del VIAA por un antígeno recombinante del VFA, la polimerasa 3D, tiene considerables atracciones, dado que proporciona un suministro ilimitado de material inocuo, económico, fácilmente purificable y consistente. Asimismo, este enfoque elimina la presencia potencial de cualquier antígeno no específico en las preparaciones del VIAA, como pueden ser proteínas derivadas de células BHK o componentes de la cápside del VFA, y que pueden ser reconocidos en la prueba de IDGA-VIAA por el suero de animales inoculados con vacunas producidas en BHK, llevando a resultados falso-positivos. En este estudio, se examinó la efectividad del uso del polipéptido 3D recombinante, obtenido en su forma nativa, construido y purificado como descripto previamente (10), en una prueba de IDGA (IDGA-3D), para la detección de anticuerpos específicos de infección con VFA,

independientemente de la condición de vacunación.

El estudio comparativo del uso del VIAA tradicional y del polipéptido recombinante 3D en la prueba de IDGA indica que ninguno de los dos antígenos ofreció ninguna ventaja particular con respecto a la definición de las bandas de precipitación. No se observó diferencia en la posición, intensidad, velocidad de formación y visibilidad de las bandas de precipitación.

La alta especificidad de la prueba de IDGA-3D puede ser observada por los resultados negativos obtenidos con 250 sueros de bovinos provenientes de áreas libres de FA. Por lo tanto, la alta especificidad del IDGA-VIAA fue mantenida al usar el antígeno recombinante.

El análisis mediante IDGA-3D de 60 sueros de bovinos involucrados en focos, sangrados entre 20 y 40 días después de la confirmación de la enfermedad, demostró resultados positivos. Por lo tanto, no se registra ninguna diferencia en la sensibilidad del test de IDGA-3D con respecto a la prueba IDGA-VIAA. La titulación de los sueros reactivos por la prueba de IDGA-3D daba valores entre 1 a 3 veces mayores que los conseguidos con la prueba de IDGA-VIAA, dependiendo de la preparación de VIAA utilizada. El análisis de sueros colectados secuencialmente de 4 bovinos persistentemente infectados indicó que independientemente del lote de 3D utilizado, la prueba de IDGA-3D detecta anticuerpos indicativos de replicación viral hasta aproximadamente 280 días después de la infección. Dicha fase de la infección pudo detectarse con una única de las cuatro

preparaciones de VIAA estudiadas. Estos resultados indican claramente la mayor consistencia de los resultados de IDGA obtenidos con el antígeno recombinante 3D, cuando comparados con aquellos obtenidos con la preparación del VIAA tradicional, particularmente al evaluar sueros de bajo título.

Seguidamente, los estudios se dirigieron a determinar si el IDGA-3D conseguía eliminar los resultados positivos obtenidos con el test de IDGA-VIAA con sueros de animales luego de la vacunación (2). Con este objetivo se examinó la reactividad de sueros con un número inesperadamente alto de resultados positivos por IDGA-VIAA. Se estudiaron muestras de bovinos sistemáticamente vacunados provenientes de regiones libres de FA durante por lo menos los últimos 3 años, que mostraban resultados positivos en el IDGA-VIAA aún en 61% (147/240) de los sueros obtenidos de animales > 2 años, y en 11% (22/207) de aquellos colectados de bovinos < de 2 años (pero mayores de seis meses), nacidos después del último foco de FA. De los sueros IDGA-VIAA-positivos en la población mayor y menor de 2 años de edad, 91% y 41%, respectivamente, reaccionaron también con la proteína recombinante 3D. La positividad total se redujo a 55% y 4% en los animales > y < de 2 años, respectivamente. Asimismo, se analizó la reactividad de sueros con un número inesperadamente alto de resultados IDGA-VIAA-positivos (78 de 90) obtenidos 30 días después de que una única dosis de vacuna fuera aplicada 120 días después de la vacunación inicial. Los antígenos de la vacuna habían sido obtenidos a partir de células BHK infectadas, crecidas en frascos roller y, a diferencia de lo que ocurre en los procedimientos de producción standard, estos

antígenos no se clarificaron y se concentraron cuatro veces. De los 78 sueros VIAA-positivos, 7 negativizaron en el IDGA-3D. También fueron analizados sueros experimentales de dos grupos de 20 bovinos, cada uno vacunado y revacunado dos veces en intervalos de 60-días, con vacunas preparadas con antígenos producidos en cultivos de células en suspensión y concentrados hasta 18 y 54 µg/5ml de dosis. La mayoría de los animales que eran IDGA-VIAA-positivos entre 15 y 30 días después de la revacunación confirmaron reactivos por IDGA-3D.

Los datos indicaron claramente que algunos de los resultados falso positivos por IDGA-VIAA en sueros de animales post-vacunados fueron eliminados por IDGA-3D. En la mayoría de los casos, sin embargo, la reactividad se mantuvo y probablemente representa existencia de anticuerpos anti-3D inducidos contra la ARN polimerasa presente en las preparaciones de la vacuna. De hecho, resultados de Rowlands y colaboradores (14) mostraron que antisuero producido en cobayos que habían recibido partículas purificadas de virus inactivo reaccionaban con antígeno VIAA aislado del virus. Una evidencia más reciente obtenida por microscopía electrónica indicó que la proteína 3D es un componente de por lo menos 20-30% de las partículas virales (11). La falta de reactividad contra 3D en muchos de los animales vacunados puede deberse a una concentración insuficiente del polipéptido 3D en las suspensiones virales, así como a la sensibilidad relativamente baja de la prueba de IDGA. En este contexto, el mismo antígeno recombinante 3D utilizado en pruebas inmunoenzimáticas (10), claramente mostró que existen anticuerpos contra 3D en el suero

de muchos animales vacunados. Tales reactividades son particularmente evidentes después de la revacunación. O'Donnell y colaboradores (12), usando otra proteína 3D recombinante expresada en bacteria demostró resultados positivos para anticuerpos anti-3D en forma transitoria en sueros de animales inmunizados con vacunas provenientes de uno de los dos productores probados. Teniendo en cuenta: a) las observaciones arriba expresadas; b) que los métodos para purificación y concentración de antígeno pueden variar ampliamente entre los laboratorios de América del Sur que fabrican las vacunas; c) que, bajo condiciones de campo se espera alta inmunidad poblacional en áreas con programas avanzados de erradicación; y d) que la inducción de anticuerpos luego de la inmunización puede estar afectada por la edad del animal, por 'boosters' provocados por infecciones anteriores, y por los ciclos de vacunación, los antígenos 3D/VIAA deben usarse con reserva, por lo menos, cuando se requieren ensayos muy sensibles.

Se ha logrado gran progreso al conseguir distinguir inequívocamente, en el campo, animales infectados de los no infectados, independientemente de su estado de vacunación, mediante el uso de antígenos virales no capsídicos obtenidos por ingeniería genética, adicionales al 3D, en un ensayo de EITB (4), o en pruebas de ELISA (7). A pesar de su alta sensibilidad, estas pruebas eliminaron un número grande de resultados VIAA/3D-IDGA-positivos debidos a vacunación y revacunación. Esta máxima sensibilidad puede mantenerse, considerando que el análisis simultáneo de varios antígenos permite mantener también una alta especificidad. Debido a la alta sensibilidad y especificidad, estos

ensayos permiten la confirmación de ausencia de actividad viral según recomendación de la Oficina Internacional de Epizootias, para el reconocimiento internacional de región libre de FA. La aplicación de herramientas tan sensibles es también pertinente durante los procesos de erradicación previos a la suspensión de la vacunación y también como un dato adicional en el análisis de riesgo para la selección de animales destinados a importación/exportación.

A pesar de que para este último propósito, la prueba de IDGA no posee la sensibilidad suficiente, aún así es una herramienta útil en muchos laboratorios, como un dato adicional en los estudios que se realizan periódicamente para determinar la prevalencia e incidencia de anticuerpos contra VIAA/3D en la población animal susceptible a la enfermedad, así como para establecer si un rebaño ha tenido o no contacto reciente con el virus de la FA. Para estos casos el uso de un antígeno recombinante garantiza la inocuidad, y en relación al IDGA-VIAA tradicional ofrece un método más consistente, con especificidad comparable, y por lo menos la misma sensibilidad.

## REFERENCIAS

1. Alonso A, Sondahl MS. Preparación y concentración de los antígenos 140 S, 12 S y VIA del virus de la fiebre aftosa. Bol Cent Panamerican Fiebre Aftosa 1975; (17-18): 1-6.
2. Alonso Fernández A, Gomes I, Bahnemann H. The induction of antibodies against VIAA in cattle vaccinated and revaccinated with inactivated foot-and-mouth disease vaccine. Bol Cent Panamerican Fiebre Aftosa 1988; (54): 43-50.
3. Alonso Fernández A, Gomes MPD, Martins MA, Sondahl MS. Detection of foot-and-mouth disease

- virus infection associated antigen antibodies: comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay and agar gel immunodiffusion test. *Prev Vet Med* 1990; 9: 233-240.
4. 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; 6:825-841.
  5. Cowan KM, Graves JG. A third antigenic component associated with FMD infection. *Virology* 1966; 30: 528-540.
  6. Mackay DKJ, Madekurozwa RL. Assessment of the VIAA ELISA for FMD. Report for the Community Reference Laboratory for FMD. Pirbright: Institute for Animal Health; 1992.
  7. Mackay DKJ, Forsyth M, Davies PR, Berlinzani A, Belsham GJ, Flint M, Ryan MD. Differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease using a panel of recombinant non-structural proteins in ELISA. *Vaccine* 1994; 16:446-459.
  8. McVicar JW, Sutmoller P. Foot-and-mouth disease: the agar gel diffusion precipitin test for antibody to virus infection-associated (VIA) antigen as a tool for epizootiologic surveys. *Am J Epidemiol* 1970; 92:273-278.
  9. Morgan DO, Moore DM, McKercher PD. Purification of foot-and-mouth disease virus infection-associated antigen. In: Proceedings Eighty-Second Annual Meeting of the United States Animal Health Association; 1978 Oct 29-31, Nov 1-3, Buffalo, New York. Richmond, Virginia: USAHA; 1978. pp. 277-283.
  10. Neitzert E, Beck E, Augé de Mello P, Gomes I, Bergmann IE. Expression of the aphthovirus RNA polymerase gene in *E. coli* and its use together with other bioengineered non-structural antigens in detection of late persistent infections. *Virology* 1991;184:799-804.
  11. Newman JFE, Piatti PG, Gorman BM, Burrage TG, Ryan MD, Flint M, Brown F. Foot-and-mouth disease virus particles contain replicase protein 3D. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:733-737.
  12. O'Donnell VK, Boyle DB, Sproat K, Fondevila AF, Schudel AA, Smitsaart EN. Detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus using a liquid-phase blocking sandwich ELISA (LPBE) with a bioengineered 3D protein. *J Vet Diagn Invest* 1996; 8: 143-150.
  13. Polatnik J, Arlinghaus RA. Foot-and-mouth disease virus-induced RNA polymerase in baby hamster cells. *Virology* 1967; 31: 601-608
  14. Rowlands DJ, Cartwright B, Brown F. Evidence for an internal antigen in foot-and-mouth disease virus. *J Gen Virol* 1969; 4:479-487.
-

**Short Report**

**USE OF A RECOMBINANT  
FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS 3D POLYMERASE IN AN  
AGAROSE GEL IMMUNODIFFUSION TEST**

Bergmann Ingrid E.<sup>1</sup>, Malirat Viviana<sup>1</sup>, Falczuk Abraham<sup>2</sup>, Sondahl Magnus S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS)

Caixa Postal 589 20001-970 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>2</sup>Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA)

Av. Fleming 1653, Martínez, Buenos Aires, Argentina

*In the present study, examination was made of the effectiveness of a complete recombinant 3D polypeptide in an AGID test (AGID-3D), for use in the detection of FMDV-infection-specific antibodies, regardless of vaccination condition. Results indicate that compared with the traditional AGID VIAA, the AGID 3D offers, particularly when assessing low titer sera, a more consistent method, with comparable specificity, and at least equal sensitivity. Neither of the antigens offered any particular advantage with regard to band differentiation. Replacement of the VIAA by a recombinant 3D antigen has considerable attractions, since it provides an unlimited supply of a safe, inexpensive, easily purified and consistent material, eliminating the potential presence of non-specific BHK or capsidal antigens.*

The term “virus infection associated antigen” (VIAA) of foot-and-mouth disease virus (FMDV) conventionally refers to a complex of non-structural proteins identified by Cowan and Graves (5), the major component of which is the viral RNA polymerase, 3D (13).

The first reported technique for detecting antibodies against VIAA as an aid to indicate previous FMDV infection was the agar gel immunodiffusion test (AGID) (8). Due to the low sensitivity of this assay, Alonso collaborators (3), developed a liquid-phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA-VIAA) to identify and quantify antibodies against FMDV-VIAA. However, the improved sensitivity attained by applying this kind of assay, when compared with the AGID-VIAA,

---

Reprint requests to:  
Pan American Foot-and-Mouth Disease (PAHO/WHO).

increased the number of VIAA-positive results in cattle vaccinated and reimmunized with vaccines containing high concentrations of non-purified FMDV antigens. Moreover, limited reproducibility of the VIAA tests(6) (I. Bergmann personal communication) appears to be an inherent property of the semi-purified nature of the VIAA preparations, which are subjected to variation in antigen quality among different batches. Furthermore, for production of conventional antigen, the FMDV-VIAA is partially purified from virus suspensions produced in baby hamster kidney (BHK) cells, which requires a high-security laboratory unit for handling FMDV (1,9).

To overcome the mentioned limitations, the replacement of the VIAA by a recombinant FMDV polymerase (3D) antigen has considerable attractions, since it provides an unlimited supply of a safe, inexpensive, easily purified and consistent material. Moreover this approach eliminates the potential presence of non-specific antigens, like BHK or capsidial antigen components in the VIAA preparations, which may be recognized in the AGID-VIAA test by sera from cattle inoculated with BHK-produced vaccines, leading to false-positive results. In the present study, examination was made of the effectiveness of a complete recombinant 3D polypeptide, constructed and purified as described previously (10), in an AGID test (AGID-3D), for use in detection of FMDV-infection-specific antibodies, regardless of vaccination condition.

A comparative study of the use of the traditional VIAA and the recombinant 3D polypeptide in an AGID test indicated that neither of the antigens offered any particular advantage with regard to band differentiation.

No difference in the positions, intensity, rate of formation and visibility of the precipitation bands was observed.

High specificity of the AGID-3D test was indicated by negative results for 250 sera from cattle in aphthovirus-free areas. Thus, high specificity of the AGID-VIAA was maintained when using the recombinant antigen.

AGID-3D-positive results were obtained when sera from 60 cattle involved in field outbreaks, bled 20-40 days after detection of the disease, were assessed. Therefore, no difference with the overall sensitivity of the AGID-VIAA test could be established. Titration of the reactive sera in the AGID-3D gave values 1-3 times higher than those obtained in the AGID-VIAA, depending on the VIAA preparation. Follow-up of sequentially collected sera from 4 persistently infected cattle indicated that irrespective of the 3D batch, AGID-3D detected antibodies indicative of viral replication for up to about 280 days after infection. Such stage of the infection could be detected with only one of the four VIAA preparations studied. These findings clearly indicate the increased consistency of the AGID results obtained with the recombinant 3D antigen when compared to those yielded by the traditional VIAA preparation, particularly when assessing low-titer sera.

Further studies were conducted to determine whether the AGID-3D could eliminate positive results yielded by AGID-VIAA for post-vaccination sera (2). To this effect, the reactivity of sera with an unexpectedly high number of AGID-VIAA-positive results was examined. Samples from systematically vaccinated cattle in regions with no FMD for at least the past 3 years, yet

showing AGID-VIAA-positive results in 61% (147/240) of the sera obtained from cattle > 2 years old, and in 11% (22/207) of those collected from the < 2 years old cattle, born after the last FMD outbreak, were studied. Of the AGID-VIAA-positive sera in the population over and under than 2 years of age, 91% and 41%, respectively, also reacted with the recombinant 3D. Overall positivity was reduced to 55% and 4% in the > and < 2 years old cattle, respectively. Similarly, reactivity of sera with unusually high number of AGID-VIAA-positive results (78 of 90 cattle) obtained 30 days after a single dose of vaccine had been administered 120 days after initial vaccination was assessed. Vaccine antigens were obtained in roller flasks, and in contrast to standard production procedures, these antigens were not clarified; also, they were concentrated fourfold. Of the 78 VIAA-positive sera, 7 became negative in the AGID-3D. Also analyzed were experimental sera from two groups of 20 cattle, each vaccinated and revaccinated twice at 60-day intervals, with vaccines prepared with antigens produced in suspension cell cultures and concentrated to 18 and 54 µg/5ml dose were also analyzed. Most of the cattle, which were AGID-VIAA-positive between 15 and 30 days after revaccination, were also reactive by AGID-3D.

These data clearly indicated that a number of AGID-VIAA-false-positive results in post-vaccinated sera were eliminated by AGID-3D. In most cases, however, such reactivities were maintained and likely represented anti-3D antibodies elicited against the RNA polymerase present in the vaccine preparations. In fact, early findings by Rowlands and collaborators (14) showed that antiserum produced in guinea pigs that had received highly purified inactivated

virus particles reacted with VIA antigen isolated from virus. More recent evidence by electron microscopy indicated that the 3D protein is a component of at least 20-30% of the virus particles (11). Failure to detect reactivity against 3D in many vaccinated animals may be related to insufficient concentration of the 3D polypeptide in the viral suspensions, as well as to the relatively low sensitivity of the AGID test. In this context, the same recombinant 3D applied in immunoenzymatic tests (10), clearly showed that antibodies against 3D are present in sera from many vaccinated cattle. Such reactivities become particularly evident after revaccination. O'Donnell and collaborators (12), using another bacterially expressed 3D recombinant protein established anti-3D antibody-positive results transiently in sera from cattle immunized with vaccines from one out of the two producers tested. Taking into account: a) the observations mentioned above; b) that methods for antigen purification and concentration used to manufacture vaccines in laboratories in South America may vary widely; c) that under field conditions high immunological coverage is expected in areas with advanced eradication programs; and d) that stimulation of antibodies upon immunization can be affected by animal age, boosters from previous infections and vaccination cycles, the 3D/VIAA should be used with caution, at least, when highly sensitive assays are required.

Great progress has been made to distinguish unequivocally in a field setting infected from non-infected animals, regardless of their vaccination condition, by the use of additional bioengineered non-capsideal viral antigens, other than 3D, in an EITB assay (4), or

ELISA tests (7). In spite of the high sensitivity, the tests eliminated a large number of VIAA/3D-AGID-positive results due to vaccination and revaccination. Maximum sensitivity could be maintained under the assumption that the simultaneous assessment of many antigens will resolve the consequent loss of specificity. Because of the high sensitivity and specificity, these assays allow confirmation of the absence of FMDV activity as required by the Office International des Epizooties for international recognition as being FMD-free. The application of such sensitive tools is also relevant during the eradication process prior to suspension of vaccination and as an input in risk analysis for import/export testing.

Although for the latter purposes, the AGID test lacks sufficient sensitivity, it is still a useful tool in many laboratories, as an aid in periodical surveys to determine the prevalence and incidence of antibodies against VIAA/3D in the animal population susceptible to the disease, and to establish whether a herd has or has not had recent contact with the FMD virus. For such cases the use of a recombinant antigen guarantees biosafety, and compared with the traditional AGID VIAA, offers a more consistent method, with comparable specificity, and at least equal sensitivity.

## REFERENCES

1. Alonso Fernández A, Sondahl MS. Preparación y concentración de los antígenos 140 S, 12 S y VIA del virus de la fiebre aftosa. Bol Cent Panamericano Fiebre Aftosa 1975; (17-18): 1-6.
2. Alonso Fernández A, Gomes I, Bahnemann H. The induction of antibodies against VIAA in cattle vaccinated and revaccinated with inactivated foot-and-mouth disease vaccine. Bol Cent Panamericano Fiebre Aftosa 1988; (54): 43-50.
3. Alonso Fernández A, Gomes MPD, Martins MA, Sondahl MS. Detection of foot-and-mouth disease virus infection associated antigen antibodies comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay and agar gel immunodiffusion test. Prev Vet Med 1990; 9: 233-240.
4. 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; 6: 825-841.
5. Cowan KM, Graves JG. A third antigenic component associated with FMD infection. Virology 1966; 30: 528-540.
6. Mackay DKJ, Madekurozwa RL. Assessment of the VIAA ELISA for FMD. Report for the Community Reference Laboratory for FMD. Pirbright: Institute for Animal Health; 1992.
7. Mackay DKJ, Forsyth M, Davies PR, Berlinzani A, Belsham GJ, Flint M, Ryan MD. Differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease using a panel of recombinant non-structural proteins in ELISA. Vaccine 1994; 16: 446-459.
8. McVicar JW, Sutmoller P. Foot-and-mouth disease: the agar gel diffusion precipitin test for antibody to virus infection-associated (VIA) antigen as a tool for epizootiologic surveys. Am J Epidemiol 1970; 92: 273-278.
9. Morgan DO, Moore DM, McKercher PD. Purification of foot-and-mouth disease virus infection-associated antigen. In: Proceedings Eighty-Second Annual Meeting of the United States Animal Health Association; 1978 Oct 29-31, Nov 1-3, Buffalo, New York. Richmond, Virginia: USAHA; 1978. pp. 277-283.
10. Neitzert E, Beck E, Augé de Mello P, Gomes I, Bergmann IE. Expression of the aphthovirus RNA polymerase gene in *E. coli* and its use together with other bioengineered non-structural antigens in detection of late persistent infections. Virology 1991; 184: 799-804.

11. Newman JFE, Piatti PG, Gorman BM, Burrage TG, Ryan MD, Flint M, Brown F. Foot-and-mouth disease virus particles contain replicase protein 3D. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:733-737.
  12. O'Donnell VK, Boyle DB, Sproat K, Fondevila AF, Schudel AA, Smitsaart EN. Detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus using a liquid-phase blocking sandwich ELISA (LPBE) with a bioengineered 3D protein. J Vet Diagn Invest 1996; 8: 143-150.
  13. Polatnik J, Arlinghaus RA. Foot-and-mouth disease virus-induced RNA polymerase in baby hamster cells. Virology 1967;31: 601-608
  14. Rowlands DJ, Cartwright B, Brown F. Evidence for an internal antigen in foot-and-mouth disease virus. J. Gen Virol 1969; 4:479-487.
- 

## RESUMO

### **Uso de uma proteína recombinante do vírus da febre aftosa, a polimerasa 3D, em uma prova de imunodifusão em gel de agar.**

Neste estudo, se examinou a efetividade do uso do polipeptídico 3D recombinante, obtido em sua forma nativa numa prova de IDGA (IDGA-3D), para uso na detecção de anticorpos específicos de infecção com VFA, independentemente da condição de vacinação. Os resultados indicam que em relação à prova tradicional de IDGA-VIAA, a IDGA 3D oferece,

particularmente quando se avaliam soros de baixo título, um método mais consistente, com especificidade comparável e pelo menos a mesma sensibilidade. Nenhum dos抗ígenos ofereceu uma vantagem particular com respeito à definição das bandas de precipitação. A substituição do VIAA pela proteína 3D recombinante tem consideráveis atrações, dado que proporciona um fornecimento ilimitado de material inócuo, econômico, de fácil purificação e consistente, eliminando a presença potencial de抗ígenos não específicos de células BHK ou componentes do capsídeo do VFA.

## Resúmenes

### Abstracts

**BARANOWSKI E, SEVILLA N, VERDAGUER N, RUIZ JARABO CM, BECK E, DOMINGO E.**

Journal of Virology 1998; 72 (8): 6362-6372. Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM), Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid.

**Determinantes múltiples de virulencia del virus de la fiebre aftosa en cultivo celular.**

Variantes hipervirulentos del virus de la fiebre aftosa (VFA) del serotipo C se presentan mediante infecciones seriadas citolíticas o persistentes en cultivo celular. Una mutación específica en el sitio interno del ribosoma de entrada del virus resistente de FA fue previamente relacionada con un incremento en la actividad de iniciación de translación la cual podría contribuir al fenotípo hipervirulento por las células BHK-21. Diversos variantes hipervirulentos del virus de la fiebre aftosa crecidos de los pasajes seriados citolíticos no presentan variabilidad del sitio de la entrada interna del ribosoma mas tienen un número de mutaciones que afectan las proteínas virales estructurales y no estructurales. La construcción de los tipos quiméricos de los transcriptos infecciosos 0-tipo C ha permitido el mapeamiento de un determinante mayor de hipervirulencia en la cápside viral. El VFA adaptado a cultivo de tejidos demostró afinidad reforzada por heparina, sin embargo el acoplamiento en la superficie celular de radicales de sulfato de heparina no fue requerido para la expresión del fenotípo hipervirulento en células de ovario de ratón

**Multiple virulence determinants of foot-and-mouth disease virus in cell culture.**

Hypervirulent variants of foot-and-mouth disease virus (FMDV) of serotype C arise upon serial cytolytic or persistent infections in cell culture. A specific mutation in the internal ribosome entry site of persistent FMDV was previously associated with enhanced translation initiation activity that could contribute to the hypervirulent phenotype for BHK-21 cells. Several hypervirulent FMDV variants arising from serial cytolytic passages show an invariant internal ribosome entry site but have a number of mutations affecting structural and nonstructural viral proteins. The construction of chimeric type O-type C infectious transcripts has allowed the mapping of a major determinant of hypervirulence to the viral capsid. Tissue culture-adapted FMDV showed enhanced affinity for heparin, but binding to cell surface heparin sulfate moieties was not required for expression of the hypervirulent phenotype in Chinese hamster ovary (CHO) cells. Virulence was identical or higher for glycosaminoglycan-deficient CHO cells than for wild-type CHO cells. FMDV variants with decreased affinity for heparin were selected

chino (OCH). La virulencia se mostró idéntica o mayor para células OCH con deficiencia en glicosaminoglican. Variantes del VFA con afinidad disminuida a la heparina fueron seleccionadas de una población paternal de alto ligamiento. Las substituciones asociadas a la disminución de acoplamiento de heparina fueron localizadas en posición 173 de la proteína capsidal VP3 y 144 de la proteína capsidal VP1. Estas substituciones tuvieron un efecto moderado en la virulencia por las células BHK-21 pero anularon completamente la infección de las células OCH. Los resultados comparativos con diversos aislamientos del virus de la fiebre aftosa muestran que i) la afinidad aumentada por heparina y las alteraciones en el tropismo celular pueden estar controlados por un número de sitios independientes en la cápside viral ii) las mismas modificaciones capsidales pueden tener diferentes efectos en diferentes tipos de células.

#### **CAMERON AR, BALDOCK FC.**

Preventive Veterinary Medicine 1998; 34 (1): 1-17. Lao-Australian Animal Health Project,  
PO Box 7042, Vientiane, Laos.

#### **Una nueva fórmula de probabilidad de los estudios para la erradicación substancial de la enfermedad.**

Este manuscrito presenta una nueva fórmula que calcula la exacta probabilidad para la detección de los animales enfermos, y considera ambas pruebas imperfectas y el tamaño de la población finito. Esta fórmula es computacionalmente inconveniente, por consiguiente, una aproximación que es más simples de calcular también es presentada. El uso de estas fórmulas para cálculo del tamaño de la muestra y análisis de los resultados del estudio es discutida. Un programa de

from a high-binding parental population. Substitutions associated with decreased heparin binding were located at positions 173 of capsid protein VP3 and 144 of capsid protein VP1. These substitutions had a moderate effect on virulence for BHK-21 cells but completely abrogated infection of CHO cells. The comparative results with several FMDV isolates show that (i) increased affinity for heparin and alterations in cell tropism may be mediated by a number of independent sites on the viral capsid and (ii) the same capsid modifications may have different effects on different cell types.

#### **A new probability formula for surveys to substantiate freedom from disease.**

This paper presents a new formula that calculates the exact probability of detecting diseased animals, and considers both imperfect tests and finite population size. This formula is computationally inconvenient, therefore an approximation that is simpler to calculate is also presented. The use of these formulae for sample-size calculation and analysis of survey results is discussed. A computer program, FreeCalc, implementing the formulae is presented along with examples of sample size

computador, de cálculo automático, implementando las fórmulas es presentado juntamente con ejemplos de cálculo del tamaño de las muestras para dos diferentes escenarios. Se sugiere que estas fórmulas y programa de computador capacitan el cálculo preciso de los requisitos de estudio de tamaño de las muestras y el análisis correcto de los resultados del estudio. Como resultado, los costos del estudio pueden ser minimizados y los resultados de ello deben fornecer con confiabilidad el nivel requerido de prueba de ausencia de la enfermedad.

calculation for two different scenarios. It is suggested that these formulae and computer program enable the accurate calculation of survey sample-size requirements, and the precise analysis of survey results. As a result, survey costs can be minimized and survey results should reliably provide the required level of proof of freedom from disease.

#### **CLERCQ K.**

Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Épizooties 1998; 17 (3): 786-795. Veterinary and Agrochemical Research Centre, Groeselenberg 99, 1180 Ukkel, Belgium.

#### **Implementación de una garantía de calidad en los laboratorios nacionales de fiebre aftosa, basada en las diretrices del Organismo Internacional de Epizootias.**

El acto final del Round Uruguayo del Acuerdo General en Impuestos y Comercio, 1994, contiene el Acuerdo en la Aplicación de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias, que visa reducir los efectos negativos de las barreras en salud en el mercado internacional a un mínimo. Por consiguiente, el Organismo Internacional de Epizootias (OIE) Comisión Regional para la Europa ha propuesto que un sistema de acreditación basado en el standard EN 45000 debe ser aplicado para alcanzar el reconocimiento internacional de los certificados y pruebas laboratoriales. A fin de alcanzar esa meta, la Comisión de Standards de la OIE publicó una serie de directrices para la evaluación de la calidad laboratorial y de las pruebas de proficiencia. En 1995, la Organización de la Alimentación y Agricultura (FAO), Comisión Europea para el

#### **Implementation of quality assurance in national foot-and-mouth disease laboratories, based on the guidelines of the Office International des Epizooties.**

The final act of the Uruguay Round of the General Agreement on Tariffs and Trade, 1994, contains the Agreement on the Application of Sanitary and Phytosanitary Measures, which aims to reduce the negative effects of health barriers on international trade to a minimum. Therefore, the Office International des Epizooties (OIE) Regional Commission for Europe proposed that an accreditation system based on the EN 45000 standard should be applied to achieve international recognition of certificates and testing laboratories. To this end, the OIE Standards Commission published a series of guidelines for the evaluation of laboratory quality and proficiency testing. In 1995, the Food and Agriculture Organization, European Commission for the Control of Foot-and-

Control de la Fiebre Aftosa, recomendó que la propuesta de la OIE debería ser aplicada en todos los laboratorios de diagnóstico de la fiebre aftosa (FA) en Europa. Esta revisión sumariza el standard EN 45001 y las directrices de la OIE, y propone que estas directrices deban tomarse como una base para la implementación de un programa de seguridad de calidad en los laboratorios de la FA.

Mouth Disease recommended that the OIE proposal should be applied in all foot and mouth disease (FMD) diagnostic laboratories in Europe. This review summarizes the EN 45001 standard and the OIE guidelines, and proposes that these guidelines should be taken as a basis for the implementation of a quality assurance programme in FMD laboratories.

### **COX SJ, BARNETT PV, DANI P, SALT JS.**

Vaccine 1999; 17 (15-16): 1858-1868. Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory, Ash Road, Pirbright, Woking, Surrey GU24 0NF, UK.

### **Vacunación de emergencia en ovejas contra la fiebre aftosa: protección contra la enfermedad y reducción de la transmisión por contacto.**

La habilidad de diversas formulaciones de vacuna de emergencia contra la fiebre aftosa para despertar inmunidad protectora temprana en ovejas, fue examinada usando 52 ovejas Polled Dorset con edad entre 6-12 meses. Todas las formulaciones de vacuna protegieron las ovejas contra el desafío en aerosol con el virus homólogo de la fiebre aftosa (VFA) con 4 días de vacunación. La protección fue asociada en parte con la inducción de la respuesta de anticuerpos en suero y también fue demostrada por la ausencia de respuesta de cualquier anticuerpo perceptible en el momento del desafío. Las formulaciones de la vacuna *acuosa Saponina/Al(OH)<sub>3</sub>* y vacunas oleosas de emulsión basadas en el adyuvante Montanide ISA 206 redujeron la replicación del virus y los números de animales subclínicamente infectados en hasta 28 días después del desafío, cuando comparadas con animales no vacunados, consecuentemente limitando la transmisión de la enfermedad o infección a los animales susceptibles por contacto.

### **Emergency vaccination of sheep against foot-and-mouth disease: protection against disease and reduction in contact transmission.**

The ability of several emergency FMD vaccine formulations to elicit early protective immunity in sheep was examined using 52 Polled Dorset sheep aged 6-12 months. All vaccine formulations protected sheep against airborne challenge with homologous FMDV within 4 days of vaccination. Protection was associated in part with the induction of serum antibody responses but was also demonstrated in the absence of any detectable antibody response at the time of challenge. Aqueous Al(OH)<sub>3</sub>/saponin vaccine formulations and oil emulsion vaccines based on Montanide ISA 206 adjuvant reduced virus replication and the numbers of animals subclinically infected up to 28 days after challenge, when compared with non-vaccinated animals, consequently limiting transmission of the disease or infection to in-contact susceptible animals.

**DUFOUR B.**

Veterinary Research 1999; 30 (1): 27-37. Cneva Direction Generale, 23, avenue du Général de Gaulle, BP 19, 94701 Maisons-Alfort, France.

**Método de evaluación técnico y económico para utilización en el mejoramiento de las redes de vigilancia de la enfermedad infecciosa animal.**

Una herramienta de la evaluación técnica y económica cualitativa y cuantitativa fue desarrollada y aplicada a tres redes de vigilancia epidemiológica: RENESA (Una red de vigilancia francesa para salmonella y contaminación de micoplasma en las unidades de producción de pollería sujetas a los controles sanitariooficiales), la red francesa de vigilancia epidemiológica de la fiebre aftosa y el REPIMAT (La red de vigilancia epidemiológica en el Chad para las enfermedades del ganado mayor). Los puntos críticos en las redes de vigilancia epidemiológica fueron identificados usándose una versión modificada del análisis de riesgo: Método de control del punto crítico (HACCP). Una rejilla de evaluación fue validada por expertos consultados de acuerdo con el método Delphi. Un cuestionario para colectar la información solicitada para la evaluación y una guía de evaluación fue diseñada. El procedimiento de evaluación también incluyó un cálculo de costos operacionales anuales para 2 de las 3 redes. Los resultados detallados de la evaluación técnica y económica fueron usados para sugerencias específicas formuladas a fin de mejorar las redes. El costo de la implementación de estas propuestas fue calculado. Los efectos de la implementación de cada uno de los mejoramientos propuestos fueron simulados y una nueva cuenta de evaluación global fue determinada para cada red. El “valor por punto” de cada mejoramiento fue calculado y discutido.

**Technical and economic evaluation method for use in improving infectious animal disease surveillance networks.**

A qualitative and quantitative technical and economic evaluation tool was developed and applied to 3 epidemiological surveillance networks: RENESA (a French surveillance network for salmonella and mycoplasma contamination in poultry production units subject to official sanitary controls), the French Foot-and-Mouth Disease Epidemiological Vigilance Network and REPIMAT (the epidemiological surveillance network in Chad for major cattle diseases). Critical points in epidemiological surveillance networks were identified using a modified version of the hazard analysis: critical control point (HACCP) method. An evaluation grid was validated by experts consulted in accordance with the Delphi method. A questionnaire to collect the information required for the evaluation and a scoring guide was designed. The evaluation procedure also included a calculation of the annual operating costs for 2 of the 3 networks. The detailed results of the technical and economic evaluation were used to formulate specific suggestions for improving the networks. The cost of implementing these proposals was calculated. The effects of implementing each of the proposed improvements were simulated and a new global evaluation score was determined for each network. The ‘cost per point’ of each improvement was calculated and discussed. This tool for the technical and economic

Esta herramienta para la evaluación técnica y económica de las redes de vigilancia epidemiológica para enfermedades animales es propuesta en la medida que ella puede ser probada en una escala mucho más amplia y eventualmente ser usada en el mejoramiento del funcionamiento de dichas redes y para el análisis de riesgo en el mercado internacional.

evaluation of epidemiological surveillance networks for animal diseases is proposed so that it may be tested on a much wider scale and eventually be used in improving the functioning of such networks and for risk analysis in international trade.

#### **HUTBER AM, KITCHING RP, CONWAY DA.**

Tropical Animal Health and Production 1998; 30 (4): 217-227. Computing Department, Institute for Animal Health, Pirbright, GU24 0NF, UK.

#### **Control de la fiebre aftosa por vacunación y el aislamiento de animales infectados.**

Datos colectados de 19 focos de fiebre aftosa (FA) en Arabia Saudita (1988-94) fueron estudiados. En cada hacienda donde ocurrieron los focos, los bovinos eran regularmente vacunados y rebaños enteros también eran revacunados dentro de 1-2 días de diagnóstico inicial. La durabilidad de estas vacunas se extendía por 2.5 meses, proporcionando un nivel de protección del 81-98%. Sin embargo, la vacunación frecuentemente fallaba en prevenir el establecimiento, y algunas veces la persistencia, de la enfermedad. Se sugirió que esto ocurre debido a que la naturaleza altamente contagiosa del VFA crea niveles aumentados de excreción viral durante un foco, y la co-habitación en haciendas de Arabia Saudita de animales susceptibles/afectados conforme el diagnóstico, predispone el rebaño a la reinfección. La excreción pre-clínica del virus

#### **Control of foot-and-mouth disease through vaccination and the isolation of infected animals.**

Data from 19 foot-and-mouth disease (FMD) outbreaks in Saudi Arabia (1988-94) were studied. On each farm on which the outbreaks occurred, the cattle were regularly vaccinated and entire herds were also re-vaccinated within 1-2 days of initial diagnosis. The durability of these vaccines extended for 2.5 months, providing an 81-98% level of protection. However, vaccination often failed to prevent the establishment, and sometimes persistence, of the disease. It is suggested that this is because the highly contagious nature of FMD creates increasing levels of viral excretion during an outbreak, and the co-habitation in Saudi farms of affected/susceptible animals following diagnosis, predisposes the herds to re-infection. Pre-clinical excretion of the virus leads to the infection of additional in-contact susceptible animals before diagnosis, so the

genera la infección de animales susceptibles por contacto antes del diagnóstico, de modo que el aislamiento de animales clínicamente infectados no garantiza la remoción de la infección. Se sugiere que todos los animales clínicamente infectados deben ser removidos del rebaño luego después del diagnóstico y si es posible, los animales incubados de los mismos/vecinos corrales también deben ser aislados.

isolation of clinically infected animals does not guarantee the removal of infection. It is suggested that all clinically infected animals should be removed from the herd immediately after diagnosis and if possible the incubating animals from the same/surrounding pens should also be isolated.

### **LOPEZ INZAURRALDE A, MOREIRA EC.**

Revista Brasileira de Medicina Veterinária 1998; 20 (4): 148-153. Centro Pan-American de Febre Aftosa (OPAS/OMS), Caixa Postal 598, 20001-970, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

#### **Epidemiología de la estomatitis vesicular en Brasil: una revisión.**

El manuscrito recupera la historia epidemiológica de la estomatitis vesicular en Brasil y localiza la distribución geográfica de las viroses causativas. Los autores analizaron 5.200 resultados de pruebas diagnósticas hechas por el Centro Panamericano de la Fiebre Aftosa (OPS/OMS) entre agosto del 1964 y julio del 1996. Los autores concluyen que las viroses del grupo Indiana-2 fueron responsables en Brasil por dos epidemias autolimitadas mas no han estado presente, por lo menos con actividad clínica, por más de 15 años. La situación epidemiológica del virus Alagoas debe ser considerada independiente del subtipo Indiana-2. El virus presenta actividad continua en el campo desde que fue diagnosticado por la primera vez y ha sido detectado en áreas relativamente extensas.

#### **Vesicular stomatitis epidemiology in Brazil: a review.**

The paper recovers the epidemiological history of vesicular stomatitis in Brazil and locates the geographic distribution of the causative viruses. The authors analyzed 5,200 results of diagnosis tests done by the Pan American Foot-and-Mouth Disease Center (PAHO/WHO) between August 1964 and July 1996. The authors conclude that viruses of the Indiana-2 group were responsible in Brazil for two self-limiting epidemics but have not been present, at least with clinical activity, for more than 15 years. The epidemiological situation of the Alagoas virus must be considered independent from the Indiana-2 subtype. The virus presents continuous activity in the country since it was first diagnosed and has been detected in relatively extensive areas.

**MACKAY DKJ, FORSYTH MA, DAVIES PR, BERLINZANI A, BELSHAM GJ, FLINT M, RYAN MD.**

Vaccine 1998; 16 (5): 446-459. Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory, Ash Road, Pirbright, Woking, Surrey GU24 ONF, UK.

**Diferenciando infección de vacunación contra la fiebre aftosa usando un panel de proteínas recombinantes, proteínas no-estructurales en ELISA.**

Un perfil de ELISA fue desarrollado para detectar anticuerpos contra las proteínas no estructurales (NS) Lb, 2C, 3A, 3D, y a la poliproteína 3ABC, del virus de la fiebre aftosa (VFA). El ensayo fue utilizado para examinar paneles de 30 sueros de bovinos negativos, y de animales experimentalmente infectados o vacunados. Todos los sueros de los bovinos infectados experimentalmente con cualquier de los 7 serotipos del VFA fueron positivos para el anticuerpo a 2C, 3A, 3D y 3ABC, y la mayoría fueron positivos a Lb. Las 3 categorías de sueros podrían ser diferenciadas en base de la presencia o ausencia del anticuerpo a las proteínas estructurales y/o proteínas NS del VFA. El ensayo es simple, rápido y reproducible y puede ser usado para identificar infecciones tempranas en animales que son sueropositivos por anticuerpo a las proteínas estructurales del virus. Cuando se validó el ensayo con suero de campo se demostró que el anticuerpo a 3ABC, y usualmente una o más de las otras proteínas no estructurales, sólo se descubrió en animales reportados por haber presentado signos clínicos de la FA. Los bovinos vacunados que recibieron menos que 5 vacunaciones, eran frecuentemente positivos para anticuerpos contra 3D, pero eran negativos para anticuerpos a 3ABC. Ocasionalmente animales que habían recibido más de 10 vacunaciones tenían perfiles de anticuerpo para proteína NS similares a aquellos vistos después de infección.

**Differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease using a panel of recombinant, non-structural proteins in ELISA.**

A profiling ELISA was developed to detect antibody to the non-structural (NS) proteins Lb, 2C, 3A, 3D, and the polyprotein 3ABC, of foot-and-mouth disease virus (FMDV). The assay was used to examine panels of 30 sera each from naive cattle, and from experimentally infected or vaccinated animals. All sera from cattle experimentally infected with any of the 7 serotypes of FMDV were positive for antibody to 2C, 3A, 3D and 3ABC, and the majority were positive for Lb. The 3 categories of sera could be differentiated on the basis of the presence or absence of antibody to the structural and/or NS proteins of FMDV. The assay is simple, rapid and reproducible and can be used to identify previous infection in animals which are seropositive for antibody to the structural proteins of the virus. Validating the assay with field sera demonstrated that antibody to 3ABC, and usually one or more of the other non-structural proteins, was detected only in animals reported to have shown clinical signs of FMD. Vaccinated cattle which had received less than 5 vaccinations, were frequently positive for antibody to 3D but were negative for antibody to 3ABC. Occasional animals which had received more than 10 vaccinations had NS protein antibody profiles which were similar to those seen following infection.

**MATEU MG, ESCARMIS C, DOMINGO E.**

Virus Research 1998; 53 (1):27-37. Centro de Biología Molecular ‘Severo Ochoa’ (CSIC-UAM), Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain.

**Análisis mutacional de epítopes discontinuos del virus de la fiebre aftosa usando el precursor del promoter de la cápsula sin procesar.**

El precursor de la cápsula no procesado (P1) del virus de la fiebre aftosa (VFA) ha sido expresado en células de mamífero para estudiar epítopes no continuos envueltos en la neutralización viral. Los reemplazos del aminoácido encontrados en los mutantes de los virus evasores fueron manipulados en el precursor P1 usando mutagenesis dirigida de *plasmido*. En todos los casos los reemplazos abolieron el reconocimiento del P1 no procesado por los anticuerpos monoclonales relevantes, igualmente los efectos de las sustituciones correspondientes en neutralización del virus infeccioso de la FA. Cinco residuos capsidales dentro de la misma área antigenica discontinua que nunca se encontró reemplazados en mutantes evasores también fueron manipulados en P1. Ninguna de las sustituciones afectó el reconocimiento del anticuerpo, lo que sugiere que estos residuos no estaban directamente envueltos en la interacción con los anticuerpos probados. Los resultados validan la mutagenesis dirigida al foco de construcciones que codifican los precursores capsidales como una aproximación para probar la estructura de los epítopes virales discontinuos que no responden al análisis con peptídeos sintéticos.

**Mutational analysis of discontinuous epitopes of foot-and-mouth disease virus using an unprocessed capsid promoter precursor.**

An unprocessed capsid precursor (P1) of foot-and-mouth disease virus (FMDV) has been expressed in mammalian cells to study discontinuous epitopes involved in viral neutralization. Amino acid replacements found in virus-escape mutants were engineered in the P1 precursor by site-directed mutagenesis of the plasmid. In all cases the replacements abolished recognition of unprocessed P1 by the relevant monoclonal antibodies, paralleling the effects of the corresponding substitutions in neutralization of infectious FMDV. Five capsid surface residues within the same discontinuous antigenic area that were never found replaced in escape mutants were also engineered in P1. None of the substitutions affected antibody recognition, suggesting that these residues were not directly involved in the interaction with the antibodies tested. The results validate site-directed mutagenesis of constructs encoding capsid precursors as an approach to probe the structure of viral discontinuous epitopes not amenable to analysis with synthetic peptides.

**MATTION N, SMITSAART E, MAZZA M, HARRISON N, FILIPPI JL, ROBIOLO B, PERILO O, TORRE J, BELLINZONI R.**

Veterinaria Argentina 1998; 15 (148): 563-572. Biogénesis S.A., Ruta Panamericana km 38.2, (1619) Garín, Buenos Aires, Argentina.

**Vacuna de emergencia contra la fiebre aftosa:  
Inducción temprana de inmunidade en  
especies susceptibles.**

Un total de 108 bovinos, 22 cerdos y 30 caprinos fueron usados para probar 15 diferentes vacunas tetravalentes contra la fiebre aftosa (10 en bovinos, 2 en cerdos y 3 en caprinos). 30 días después de la vacunación, los niveles de anticuerpo eran más altos en aquellas vacunas conteniendo saponina inmunomoduladora. Las vacunas con masa antigenica reducida, mas conteniendo saponina, indujeron títulos más altos de anticuerpo que las vacunas con mayores concentraciones de 140S, pero que no tenían saponina. Ningún efecto contrario a la vacunación fue observado. Se concluye que las vacunas conteniendo saponina podrían ser usadas efectivamente para vacunación de emergencia de bovinos, caprinos y cerdos.

**Emergency foot and mouth disease vaccine:  
early induction of immunity in susceptible  
species.**

A total of 108 cattle, 22 pigs and 30 goats were used to test 15 different tetravalent foot and mouth disease vaccines (10 in cattle, 2 in pigs and 3 in goats). At 30 days after vaccination, antibody levels were higher in those vaccines containing the immunomodulator saponin. Vaccines with reduced antigenic mass, but containing saponin, induced higher antibody titres than vaccines with greater concentrations of 140S, but lacking saponin. No adverse effects of vaccination were observed. It is concluded that the saponin-containing vaccines could be used effectively for emergency vaccination of cattle, goats and pigs.

**MURPHY MLP, FORSYTH MA, BELSHAM GJ, SALT JS.**

Virus Research 1999; 62 (1): 67-76. BBSRC Institute for Animal Health, Pirbright, Woking, Surrey GU24 ONF, UK.

**Localización del RNA del virus de la fiebre aftosa por hibridización *in situ* en los tejidos bovinos.**

La hibridización *in situ* fue usada para detectar el RNA del virus de la fiebre aftosa (VFA) dentro de las células de los tejidos removidos de bovinos infectados. Una sonda de RNA de sentido negativo marcada con digoxigenina fue preparada a partir de la región del genoma de la fiebre aftosa que codifica parte del RNA polimerasa RNA dependiente (3D). La eficacia y la especificidad de esta prueba para hibridización *in situ* fue determinada usándose células infectadas con virus en cultura de tejido. Una fuerte mancha citoplásrica sólo fue detectada en las células infectadas por el VFA. Diversas muestras de tejido fueron colectadas de bovinos infectados por el VFA entre 5 y 17 días post-infección. El RNA viral fue detectado por hibridización *in situ* dentro de las células del paladar, tonsila y de la faringe hasta 17 días post-infección. Se concluye que esta técnica es útil para el estudio de localización del virus de la fiebre aftosa en bovinos tanto durante y después de la fase aguda clínica de la enfermedad y puede auxiliar en la identificación de sitios específicos de persistencia del virus.

**Localization of foot-and-mouth disease virus RNA by *in situ* hybridization within bovine tissues.**

*In situ* hybridization was used to detect foot-and-mouth disease virus (FMDV) RNA within the cells of tissues removed from infected cattle. A digoxigenin-labelled anti-sense RNA probe was prepared corresponding to a region of the FMDV genome encoding part of the RNA-dependent RNA polymerase (3D). The efficacy and specificity of this probe for *in situ* hybridization was determined using virus-infected cells in tissue culture. Strong cytoplasmic staining was only detected in FMDV-infected cells. Various tissue samples were collected from FMDV-infected cattle between 5 and 17 days post-infection. Viral RNA was detected by *in situ* hybridization within cells of the soft palate, tonsil and pharynx up to 17 days post-infection. It is concluded that this technique is useful for the study of FMDV localization in cattle both during and after the acute clinical phase of disease and may assist in identifying specific sites of virus persistence.

**NIEDBALSKI W, ADAM KH, MARQUARDT O.**

Journal of Virological Methods 1998; 72 (2): 237-242. Bundesforschungsanstalt fur Viruskrankheiten der Tiere, Paul-Ehrlich-Strasse 28, D-72076 Tubingen, Germany.

**Cuantificación de genomas del virus de la fiebre aftosa en tejido bovino mediante RT-PCR competitivo.**

La sensibilidad de una transcripción inversa asociada a una reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) para detectar genomas del virus de la fiebre aftosa (VFA) fue cuantificada por el uso del RNA transcritio in vitro del cDNA específico del virus de la fiebre aftosa. Previamente, el cDNA había sido alargado para 228 bp. El número mínimo de moléculas molde requeridas para obtener el producto específico RT-PCR fue determinado para ser 104. Eso se alcanzó a través del uso de 1 µg de primer para la síntesis cDNA y aplicando al menos 30 ciclos de PCR. El conocimiento de la sensibilidad del sistema capacitó el examen de las muestras clínicas para el contenido de los genomas del VFA. Las muestras se basaban en epitelio lingual y del podal así como la descarga nasal, removidos 11-14 días luego de la infección de los 14 bovinos. Todos los bovinos demostraron contener genomas del VFA, mas no en cada especie clínica. La diferencia de tamaño de los productos ampliados del genoma transcritio y viral posibilitó la estimación por RT-PCR competitivo del número de genomas virales existentes en algunas muestras. El RNA extraido de aproximadamente 107 tejidos de células de cada epitelio lingual y podal poseían entre <106 y 108 genomas del VFA.

**Quantification of foot-and-mouth disease virus genomes in bovine tissue by competitive RT-PCR.**

The sensitivity of a reverse transcription-dependent polymerase chain reaction (RT-PCR) for detecting foot-and-mouth disease virus (FMDV) genomes was quantified by use of RNA transcribed in vitro from FMDV-specific cDNA. Previously, the cDNA had been elongated by 228 bp. The minimum number of template molecules required to obtain the specific RT-PCR product was determined to be 104. This was achieved by use of 1 µg of primer for cDNA synthesis and by undertaking of at least 30 cycles of PCR. Knowing the sensitivity of the system prompted the examination of clinical samples for content of FMDV genomes. The samples were tongue and foot epithelia as well as nasal discharge, removed 11-14 days after infection from 14 cattle. All cattle were shown to carry FMDV genomes, but not in each clinical specimen. The size difference of the products amplified from transcript and viral genome enabled the estimate by competitive RT-PCR of the number of viral genomes contained in some samples. The RNA extracted from approximately 107 tissue cells each of tongue and foot epithelia contained between <106 and 108 FMDV genomes.

**REID SM, FORSYTH MA, HUTCHINGS GH, FERRIS NP.**

Journal of Virological Methods 1998; 70 (2): 213-217. Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory, Pirbright, Woking, Surrey GU24 0NF, UK.

**Comparación de la transcripción invertida de la reacción en cadena de polimerasa, ELISA y aislamiento viral para el diagnóstico de rutina de la fiebre aftosa.**

Un método de transcripción invertida de la reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR) fue comparada con aislamiento del virus en cultivo celular y el ELISA de antígeno detector para el diagnóstico primario de la fiebre aftosa (FA) en 166 muestras clínicas de campo de bovinos, ovejas, cerdos y caprinos. 80 muestras fueron positivas por aislamiento viral/ELISA y 78 por RT-PCR. El RT-PCR detectó RNA viral de la FA en 11 de las 86 muestras consideradas negativas por el aislamiento viral/ELISA mas fallaron en diagnosticar 13 muestras identificadas como positivas por los últimos procedimientos. Este RT-PCR no es un serotipo específico de modo que un producto cDNA es indicativo de la presencia de RNA viral de la FA. La confirmación de la especificidad del producto cDNA y la identificación del serotipo requiere el análisis de la secuencia del nucleotídeo. Se concluye que el valor del RT-PCR es que ello puede facilitar rápidamente el análisis molecular de aislados de campo y así proveer información epidemiológica importante con respecto a la fuente de focos. Sin embargo, esa es una técnica sofisticada que requiere equipo especializado, pericia y reactivos refinados y tiene que ser usada en conjunto con procedimientos corrientes para el diagnóstico de la FA.

**Comparison of reverse transcription polymerase chain reaction, enzyme linked immunosorbent assay and virus isolation for the routine diagnosis of foot-and-mouth disease.**

A reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) method was compared with virus isolation in cell culture and the antigen detection ELISA for the primary diagnosis of foot-and-mouth disease (FMD) on 166 clinical field samples from cattle, sheep, pigs and goats. 80 samples were positive by virus isolation/ELISA and 78 by RT-PCR. The RT-PCR detected FMD viral RNA in 11 of the 86 samples assessed as negative by virus isolation/ELISA but conversely failed to diagnose 13 samples identified as positive by the latter procedures. This RT-PCR is not serotype-specific so a cDNA product is indicative of the presence of FMD viral RNA only. Confirmation of the specificity of the cDNA product and the identification of the serotype requires nucleotide sequence analysis. It is concluded that the value of the RT-PCR is that it can rapidly facilitate the molecular analysis of field isolates and thus provide important epidemiological information regarding the source of outbreaks. However, it is a sophisticated technique requiring specialized equipment, expertise and refined reagents and has to be used in conjunction with current procedures for FMD diagnosis.

**REID SM, HUTCHINGSGH, FERRISNP, CLERCQ K.**

Journal of Virological Methods 1999; 83 (1-2): 113-123. Institute for Animal Health, Pirbright, Woking, Surrey, GU24 0NF, UK.

**Diagnóstico de la fiebre aftosa por RT-PCR:  
Evaluación de iniciadores para caracterización  
serotípica de RNA viral en muestras clínicas.**

Los iniciadores múltiples diseñados a partir de regiones 1D y 2AB del genoma viral de la fiebre aftosa (FA) fueron evaluados extensivamente para la detección de todos los 7 serotipos del virus por transcripción invertida de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Los primers habían caracterizados previamente en otro lugar en un número relativamente pequeño de aislados crecidos en cultivo celular y suspensiones epiteliales, mostrándose capaces de identificar y diferenciar todos los 7 serotipos del virus de la FA. El estudio evaluó diversos protocolos de RT-PCR en suspensiones epiteliales y flúidos sobrenadantes, resultantes de sus pasajes en cultivo celular, derivadas de muestras clínicas de diversas características moleculares. Cada uno de los primers de serotipo específico en protocolos RT-PCR seleccionados, demostraron especificidad apropiada y detectó aislamientos pasados en cultivo celular con algún éxito mas no fueron adecuados para la serotipificación de suspensiones preparadas de muestras clínicas de epitelio. Se concluye que los primers pueden ser usados en procedimientos de RT-PCR en conjunto con los métodos detectores de rutina de aislamiento viral y ELISA para el diagnóstico e serotipificación del virus de la fiebre aftosa.

**Diagnosis of foot-and-mouth disease by RT-PCR: evaluation of primers for serotypic characterization of viral RNA in clinical samples.**

Multiple primers designed from the 1D and 2AB regions of the foot-and-mouth disease (FMD) viral genome were evaluated extensively for the detection of all 7 serotypes of the virus by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The primers had been characterized previously elsewhere on a relatively small number of cell culture grown isolates and epithelial suspensions and had been shown to identify and differentiate all 7 serotypes of FMD virus. The extended study evaluated several RT-PCR protocols on epithelial suspensions and supernatant fluids, resulting from their passage in cell culture, derived from clinical samples of diverse molecular characteristics. Each of the serotype-specific primers in selected RT-PCR protocols demonstrated suitable specificity and detected cell culture passaged isolates with some success but were not adequate for the serotyping of suspensions prepared from clinical samples of epithelium. It is concluded that the primers can be used in RT-PCR procedures in conjunction with the routine detection methods of virus isolation and ELISA for the diagnosis and serotyping of FMD virus.

**SADIR AM, ZAMORANO PI, ROMERA A, WIGDOROVITZ A, SMITSAART E, MARANGUNICH L, SCHIAPPACASSI C, BORCA MV.**

Veterinary Immunology and Immunopathology 1999; 69 (1): 11-22. Instituto de Virología, CICV, INTA-Castelar, CC77 Morón, (1708) Pcia, Buenos Aires, Argentina.

**Mejora de la respuesta a inmunidad por la vacuna contra el virus de la fiebre aftosa en becerros mediante el uso de Avridine como adyuvante.**

36 becerros, con edad entre 8-10 meses, fueron vacunados s.c. con una vacuna tetravalente contra el virus de la fiebre aftosa (VFA), con o sin Avridina inmunomoduladora (Avr) como adyuvante. La respuesta del anticuerpo anti-VFA fue evaluada usando un bloqueador ELISA sandwich de fase líquida mientras que la respuesta celular fue detectada usando una prueba de antígeno linfoproliferativa específica. Mientras que ninguna diferencia fue detectada en la respuesta celular, la reacción al anticuerpo anti-VFA fue significativamente mayor en animales inmunizados con la vacuna conteniendo Avr. 90 días después de la vacunación, 89-100% de los animales inmunizados con la vacuna con adyuvante Avr presentaron protección pronosticada mayor que 82%, pero sólo 50-61% de los animales inmunizados con vacuna sin inmunomodulador presentaron aquella característica. El aumento del título de anticuerpo del anti-VFA en animales inmunizados con la vacuna conteniendo Avr fue mediado por un aumento en los niveles de ambos IgG1 e IgG2, el cual presentó una correlación significante con los títulos de anticuerpos ELISA. Se concluye que la adición de Avr a la vacuna de FA mejora el estado inmune de los becerros.

**Improvement of the immune response to foot-and-mouth disease virus vaccine in calves by using Avridine as adjuvant.**

36 calves, aged 8-10 months, were vaccinated s.c. with a tetravalent foot-and-mouth disease virus (FMDV) vaccine, with or without the immunomodulator Avridine (Avr) as adjuvant. The anti-FMDV antibody response was evaluated using a liquid-phase blocking sandwich ELISA while the cellular response was detected using an antigen specific lymphoproliferative test. While no differences were detected in the cellular response, the anti-FMDV antibody reaction was significantly higher in animals immunized with the vaccine containing Avr. At 90 days after vaccination, 89-100% of the animals immunized with the Avr-adjuvanted vaccine presented predicted protection higher than 82%, while just 50-61% of the animals immunized with vaccine without immunomodulator presented that characteristic. The increase in anti-FMDV antibody titre in animals immunized with the vaccine containing Avr was mediated by an increase in the levels of both IgG1 and IgG2, which presented a significant correlation with ELISA antibodies titres. It is concluded that the addition of Avr to the FMDV vaccine improves the immune status of the calves.

**SALT JS, BARNETT PV, DANI P, WILLIAMS L.**

Vaccine 1998; 16 (7): 746-754. Institute for Animal Health, Pirbright. Laboratory, Ash Road, Pirbright, Woking, Surrey GU24 0NF, UK.

**Vacunación de emergencia en cerdos contra la fiebre aftosa: protección contra la enfermedad y reducción de la transmisión por contacto.**

La habilidad protectora de dos nuevas vacunas contra la FA basadas en óleo, preparadas de un tipo de antígeno concentrado aftovirus C1 Oberbayern en cerdos fue examinada. Ambas formulaciones de vacunas demostraron proteger los cerdos contra el desafío por aerosol con el virus homólogo de la fiebre aftosa dentro de 4 días de vacunación, pero no 2 ó 3 días después de la vacunación. La protección fue asociada con la inducción de baja respuesta del título de anticuerpos. Un estudio de transmisión mostró que la inmunización protectora resultó en excreción viral reducida. La vacunación en 7 días, mas no en 4 días, antes del desafío de la preventida transmisión por contacto de la FA. Las dos formulaciones probadas en el estudio tuvieron una característica favorable de baja viscosidad, baja reactividad y alta potencia, ideal para uso en campañas de vacunación estratégicas para controlar focos de la fiebre aftosa.

**Emergency vaccination of pigs against foot-and-mouth disease: protection against disease and reduction in contact transmission.**

The protective ability of two novel oil-based FMD vaccines prepared from a type C1 Oberbayern aphthovirus antigen concentrate in pigs was examined. Both vaccine formulations were shown to protect pigs against airborne challenge with homologous FMDV within 4 days of vaccination, but not at 2 or 3 days after vaccination. Protection was associated with the induction of variable and low titre serum antibody responses. A transmission study showed that protective immunization resulted in reduced virus excretion. Vaccination at 7 days, but not at 4 days, before challenge prevented contact transmission of FMD. The two formulations tested in the study had the favorable characteristics of low viscosity, low reactivity and high potency, ideal for use in strategic vaccination campaigns to control outbreaks of FMD.

**SAMARTINO LE, FORT MC, TOME JSG, MARDUEL M, PIAZZA E, SALUSTIO E, GREGORET R.**

Revista de Medicina Veterinaria Buenos Aires 1999; 80 (3): 186-189. INTA-CCV y A, Inst. de Patobiología-Area Bacteriología, C.C. N° 77, (CP 1708) Morón, Bs. As., Argentina.

**Evaluación de protección contra la brucelosis proporcionada por cepa 19 en bovinos vacunados simultáneamente con la vacuna contra la fiebre aftosa con adyuvante oleoso.**

137 hembras fueron usadas: 53 vacunadas con cepa de *Brucella abortus* 19, 53 vacunadas simultáneamente con cepa 19 y vacuna contra la fiebre aftosa y 31 no vacunadas contra la brucelosis. Los animales fueron puestos intraconjuntivamente con cepa 2308 de *B. abortus* en el medio de la gestación. Muestras de sangre fueron sacadas periodicamente. No hubo diferencias en el nivel de infección en hembras vacunadas por las 2 técnicas. En los controles, 27 de las 27 vacas gestantes y 2 de las 4 no gestantes fueron infectadas; mientras que en animales vacunados, 55 de las 90 vacas gestantes y 3 de las 16 no gestantes fueron infectadas. Se concluye que la vacunación simultánea con la vacuna contra la FA no afecta la inmunidad conferida por la vacuna contra brucelosis cepa 19.

**Evaluation of the protection against brucellosis provided by strain 19 in cattle vaccinated simultaneously with oil-adjuvanted foot-and-mouth disease vaccine.**

137 females were used: 53 vaccinated with *Brucella abortus* strain 19, 53 vaccinated simultaneously with strain 19 and foot-and-mouth disease vaccine and 31 not vaccinated against brucellosis. The animals were challenged intraconjunctively with strain 2308 of *B. abortus* half-way through pregnancy. Blood samples were taken periodically. There were no differences in level of infection in females vaccinated by the 2 techniques. In the controls, 27 of 27 pregnant cows and 2 of 4 non-pregnant ones were infected; while in vaccinated animals, 55 of 90 pregnant cows and 3 of 16 non-pregnant ones were infected. It is concluded that simultaneous vaccination with foot-and-mouth disease vaccine does not affect immunity conferred by brucellosis strain 19 vaccine.

**SARAIVA V.**

Revista Brasileira de Medicina Veterinária 1999; 21 (5): 188-191. Centro Pan-americano de Febre Aftosa OPAS/OMS, Caixa Postal 589, CEP 20001-970, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

**Bases metodológicas para la caracterización de riesgo - [Bases metodológicas para a caracterização de risco].**

Metodologías para determinar el riesgo de la enfermedad en ganado son discutidas con respecto al concepto de riesgo; La evaluación cualitativa y cuantitativa, gerencia y comunicación de riesgo; análisis de riesgo, tomando en cuenta la prevalencia de la enfermedad en el campo estudiado, productos animales y exportaciones; y el análisis de riesgo como un medio de prevención de la enfermedad. Un mapa de distribución de la FA en América del Sur de junio del 1998, mostrando las provincias, estados y departamentos con y sin (no hay informes de enfermedad clínica por lo menos de 24 meses) la enfermedad es dado como un ejemplo.

**Methodological bases for the characterization of risk - [Bases metodológicas para a caracterização de risco].**

Methodologies for determining disease risk in livestock are discussed with reference to the concept of risk; the qualitative and quantitative evaluation, management and communication of risk; risk analysis, taking into account the disease prevalence in the country concerned, animal products and exports; and risk analysis as a means of disease prevention. A distribution map of aphthous fever [foot-and-mouth disease] in South America for June 1998, showing the provinces, states and departments with and without (no reports of clinical disease for at least 24 months) the disease is given as an example.

**SEVILLA N, RUIZ JARABO CM, GOMEZ MARIANO G, BARANOWSKI E, DOMINGO E.**

Journal of General Virology 1998; 79 (12): 2971-2980. Centro de Biología Molecular 'Severo Ochoa', Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain.

**Un virus RNA puede adaptarse a la multiplicidad de la infección.**

Evidencia directa mostró que la forma relativa de 2 subpopulaciones competitadoras de los virus RNA pueden depender de la multiplicidad de infección (m.d.i.). Dos subpoblaciones estrechamente relacionadas del virus de la fiebre aftosa (VFA) del serotipo C, que diferían en su historia de pasajes citolíticos en células BHK-21, fueron sometidas a experimentos de competición de crecimiento en celulas BHK-21. Una de las poblaciones,

**An RNA virus can adapt to the multiplicity of infection.**

Direct evidence showed that the relative fitness of 2 competing subpopulations of RNA viruses may depend on the multiplicity of infection (m.o.i.). Two closely-related subpopulations of foot-and-mouth disease virus (FMDV) of serotype C, which differed in their history of cytopathic passages in BHK-21 cells, were subjected to growth-competition experiments in BHK-21 cells. One of the populations, termed S, showed a selective

denominada S, mostró una ventaja selectiva sobre la otra población, denominada L, solo cuando los pasajes de competición eran cargadas en baja m.d.i. En contraste, ambas poblaciones, L y S, coexistían durante pasajes de serie cargadas a alta m.d.i. Ninguna diferencia entre S y L fue detectada en ensayos de inhibición de infectividad por peptídeos sintéticos, en experimentos de competición de célula acoplada, o en virulencia para células BHK-21. Sin embargo, el VFA S demostró aumento de heparina acoplada comparada con L, y virulencia más alta de L para el ovario de hamster chino que las células de ovario S. Estos resultados con el VFA sugieren que pequeñas diferencias en la interacción del virus con la célula hospedadora pueden contribuir a una m.d.i. una ventaja selectiva dependiente de una subpoblación viral sobre una subpoblación estrechamente relacionada. Por consiguiente, mutantes virales de quasiespecies replicadas in vivo pueden ser seleccionadas dependiendo del número de virus variantes relativos al número de células susceptibles.

advantage over the other population, termed L, only when the competition passages were carried out at low m.o.i. In contrast, both populations, L and S, coexisted during serial passages carried out at high m.o.i. No differences between S and L were detected in assays of inhibition of infectivity by synthetic peptides, in cell binding-competition experiments, or in virulence for BHK-21 cells. However, FMDV S showed increased heparin binding compared with L, and L higher virulence for Chinese hamster ovary cells than S. These results with FMDV suggest that small differences in the interaction of the virus with the host cell may contribute to an m.o.i.-dependent selective advantage of one viral subpopulation over a closely related subpopulation. Therefore, different viral mutants from quasispecies replicating in vivo may be selected depending on the number of variant viruses relative to the number of susceptible cells.

**SHEN F, CHEN PD, WALFIELD AM, YE J, HOUSE J, BROWN F, WANGN.**

Vaccine 1999; 17 (23-24): 3039-3049. United Biomedical, Inc, 25 Davids Drive, Hauppauge, NY 11788, USA.

**Diferenciación de animales convalecientes de aquellos vacunados contra la fiebre aftosa por un peptídeo ELISA.**

Determinantes antigenicos continuos dentro de las secuencias de aminoácido de la región no estructural conservada conteniendo proteínas 2C y 3ABC del virus de la fiebre aftosa, los cuales pueden distinguirse entre el suero de animales vacunados y animales infectados, fueron

**Differentiation of convalescent animals from those vaccinated against foot-and-mouth disease by a peptide ELISA.**

Continuous antigenic determinants within the amino acid sequences of the conserved non-structural region containing proteins 2C and 3ABC of foot-and-mouth disease virus which can distinguish between the sera from vaccinated and infected animals were

identificados. Un ELISA basado en un peptídeo 3B presentó una reacción positiva con suero de bovinos, cerdos, ovejas y cobayos infectados con todos los siete serotipos del virus, mas no con suero de animales vacunados. En experimentos con bovinos y cerdos para determinar la duración de la respuesta del anticuerpo, las reacciones positivas fueron obtenidas hasta un año después de la infección. Las ventajas de usar peptídeos de las proteínas virales no estructurales en vez de proteínas recombinantes para vacunación diferenciada de animales infectados, incluye la especificidad de ellos, la no reactividad con anticuerpos contra las proteínas derivadas de las células hospedadoras (p.e.proteínas coli y de células de insectos), y la facilidad de preparación.

identified. An ELISA based on a 3B peptide gave a positive reaction with sera from cattle, pigs, sheep and guineapigs infected with all seven serotypes of the virus, but not with sera from vaccinated animals. In experiments with cattle and pigs to determine the duration of the antibody response, positive reactions were obtained as late as one year after infection. The advantages of using peptides from the non-structural viral proteins instead of recombinant proteins for differentiating vaccinated from infected animals include their specificity, non-reactivity with antibodies against host cell-derived proteins (e.g. E. coli and insect cell proteins), and their ease of preparation.

**SORENSEN KJ, MADSEN KG, MADSEN ES, SALT JS, NQINDI J, MACKAY DKJ.**

Archives of Virology 1998; 143 (8): 1461-1476. Danish Veterinary Institute for Virus Research, Kalvehave, Denmark.

**Diferenciación entre infección y vacunación contra la fiebre aftosa a través de la detección de anticuerpos por las proteínas no estructurales 3D, 3AB y 3ABC en ELISA usando antígenos expresados en baculovirus.**

Las proteínas no estructurales (PNS) 3D, 3AB y 3ABC del virus de la fiebre aftosa (VFA) fueron usadas como antígenos para bloquear ELISAs para detección de anticuerpo en bovinos y ovejas de acuerdo a la vacunación y/o infección con el VFA. El sistema de expresión del baculovirus se mostró eficiente en expresar los 3 PNS como antígenos reconocidos por suero inmune en ELISA. Los ELISAs 3D, 3AB y 3ABC detectaron anticuerpos del día 8 y 10 después de la infección experimental de bovinos y ovejas

**Differentiation of infection from vaccination in foot-and-mouth disease by the detection of antibodies to the non-structural proteins 3D, 3AB and 3ABC in ELISA using antigens expressed in baculovirus.**

The 3D, 3AB and 3ABC non-structural proteins (NSP) of foot-and-mouth disease virus (FMDV) were used as antigens in blocking ELISAs for antibody detection in cattle and sheep following vaccination and/or infection with FMDV. The baculovirus expression system was efficient at expressing the 3 NSPs as antigens recognized by immune sera in ELISA. The 3D, 3AB and 3ABC ELISAs detected antibodies from day 8 and 10 after experimental infection of susceptible cattle and

susceptibles, respectivamente, y los bovinos permanecieron sueropositivos por más de 395 días. Los ELISAs detectaron anticuerpos contra cualquier de los 7 serotipos del VFA. El ELISA 3D fue específico y preciso y tan susceptible como los ELISAs establecidos los cuales miden el anticuerpo a las proteínas estructurales. El ensayo puede ser usado como un recurso económico alternativo para ELISAs establecidos. Los ELISAs 3AB y 3ABC también fueron específicos y precisos. Los bovinos infectados por el VFA podrían ser diferenciados de los bovinos vacunados ya que presentaron un resultado positivo en ambos ELISAs 3AB y 3ABC. Dos bovinos que habían sido vacunados e infectados también presentaron resultados positivos en ambas pruebas, sugeriendo que los ELISAs 3AB y 3ABC, excepto el ELISA 3D, podrían representar un medio confiable de detectar infección en la población vacunada.

sheep, respectively, and cattle remained seropositive for more than 395 days. The ELISAs detected antibodies against any of the 7 serotypes of FMDV. The 3D ELISA was specific and precise and as sensitive as established ELISAs which measure antibody to structural proteins. The assay may be used as a resource saving alternative to established ELISAs. The 3AB and 3ABC ELISAs were also specific and precise. FMDV-infected cattle could be differentiated from vaccinated cattle as they gave a positive result in both the 3AB and the 3ABC ELISAs. Two cattle that had been both vaccinated and infected also gave positive results in both tests, suggesting that the 3AB and 3ABC ELISAs, but not the 3D ELISA, might represent a reliable means of detecting infection in a vaccinated population.

#### **TOJA M, ESCARMIS C, DOMINGO E.**

Virus Research 1999; 64 (2): 161-171. Centro de Biología Molecular 'Severo Ochoa' (CSIC-UAM), Universidad Autónoma de Madrid, 28049-Cantoblanco, Madrid, Spain.

#### **Secuencia genómica de nucleótido de un clone de virus de la fiebre aftosa y sus derivativos persistentes. Implicaciones para la evolución de quasispecies virales durante una infección persistente.**

La secuencia del nucleótido del genoma entero del virus de la fiebre aftosa (VFA) (clone biológico C-S8c1) ha sido completada, y comparada con aquellas de dos derivativos persistentes R99 y R146, rescatadas después de 99 y 146 pasajes de las células cargadoras BHK-21. Secuencias consensuales fueron determinadas directamente de los sobrenadantes de células

#### **Genomic nucleotide sequence of a foot-and-mouth disease virus clone and its persistent derivatives. Implications for the evolution of viral quasispecies during a persistent infection.**

The consensus nucleotide sequence of the entire genome of foot-and-mouth disease virus (FMDV) (biological clone C-S8c1) has been completed, and compared with that of two persistent derivatives R99 and R146, rescued after 99 and 146 passages of the carrier BHK-21 cells. Consensus sequences were determined directly from supernatants of persistently infected cells,

persistentemente infectadas, sin intervenir en la amplificación citolítica de los virus. Estas secuencias genómicas también han sido comparadas con aquellas del VFA R100, un virus que también fue rescatado de células persistentemente infectadas antes de la secuencia. Frecuencias en la mutación para R99 y R146 relativas a C-S8c1 alcanzaron una media de substituciones por nucleotídeo de  $2.8 \times 10^{-3}$  para  $7.7 \times 10^{-3}$  por 5'-UTR y las regiones codificadas L-, P1-, P2- y P3. Ninguna mutación fue fijada en la región polimerasa de código (3D). Contrastos agudos fueron observados con relación a la distribución de tipos de mutación a lo largo de los genomas persistentes, notablemente la completa ausencia de las mutaciones de transversión dentro de 5'-UTR, comparados con 53% transversiones en las regiones codificadas L- y P1. Los resultados de secuenciamiento presentados aquí, combinados con secuencias previas de los genomas del VFA C-S8c1 en el comienzo de la persistencia, proveen la evidencia de flutuaciones de secuencia con una acumulación no lineal de mutaciones durante la persistencia prolongada, una marca de calidad de quasispecies dinámicas.

without intervening cytidylic amplification of the viruses. These genomic sequences have also been compared with that of FMDV R100, a virus that was also rescued from persistently infected cells, but that was subjected to cytidylic amplification before sequencing. Mutation frequencies for R99 and R146 relative to C-S8c1 were in the range of  $2.8 \times 10^{-3}$  to  $7.7 \times 10^{-3}$  substitutions per nucleotide for the 5'-UTR and the L-, P1-, P2- and P3-coding regions. No mutations were fixed in the polymerase (3D)-coding region. Striking contrasts were noted regarding the distribution of mutation types along the persistent genomes, notably the complete absence of transversion mutations within the 5'-UTR, compared with 53% transversions in the L- and P1-coding regions. The sequencing results presented here, combined with previous sequences of FMDV C-S8c1 genomes at the onset of persistence, provide evidence of sequence fluctuations with a non-linear accumulation of mutations during prolonged persistence, a hallmark of quasispecies dynamics.

## **Bibliografía sobre enfermedades vesiculares y zoonosis**

## **Bibliography on vesicular diseases and zoonoses**

### **Enfermedades vesiculares/Vesicular diseases**

**ALMEIDA MR, RIEDER E, CHINSANGARAM J, WARD G, BEARD C, GRUBMAN MJ, MASON PW.**

Construction and evaluation of an attenuated vaccine for foot-and-mouth disease: difficulty adapting the leader proteinase-deleted strategy to the serotype O1 virus. Virus Research 1998; 55 (1): 49-60. Plum Island Animal Disease Center, United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, North Atlantic Area, Greenport, NY 11944, USA.

**BARNETT PV, COX SJ.**

The role of small ruminants in the epidemiology and transmission of foot-and-mouth disease. Veterinary Journal 1999; 158 (1): 6-13. Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory, Ash Road, Pirbright, Working, Surrey, GU24 0NF, UK.

**BARNETT PV, SAMUEL AR, PULLEN L, ANSELL D, BUTCHER RN, PARKHOUSE RME.**

Monoclonal antibodies, against O1 serotype foot-and-mouth disease virus, from a natural bovine host, recognize similar antigenic features to those defined by the mouse. Journal of General Virology 1998; 79 (7): 1687-1697. Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory, Ash Road, Pirbright, Woking, Surrey GU24 ONF, UK.

**BASTOS ADS, BERTSCHINGER HJ, CORDEL C, KEET D, BENGIS RG, GROBLER DG, THOMSON GR, VAN VUUREN CWJ.**

Possibility of sexual transmission of foot-and-mouth disease from African buffalo to cattle. Veterinary Record 1999; 145 (3): 77-79. Onderstepoort Institute for Exotic Diseases, Private Bag X6, Onderstepoort, 0110, South Africa.

**BAYRY J, PRABHUDAS K, BIST P, REDDY GR, SURYANARAYANA VVS.**

Immuno affinity purification of foot-and-mouth disease virus type specific antibodies using recombinant protein adsorbed to polystyrene wells. Journal of Virological Methods 1999; 81 (1-2): 21-30. Indian Veterinary Research Institute, Bangalore 560 024, India.

**BEARD C, WARD G, RIEDER E, CHINSANGARAM J, GRUBMAN MJ, MASON PW, LUBITZ W.**

Development of DNA vaccines for foot-and-mouth disease, evaluation of vaccines encoding replicating and non-replicating nucleic acids in swine. *Journal of Biotechnology* 1999; 73 (2-3): 243-249. Plum Island Animal Disease Center, North Atlantic Area, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, PO Box 848, Greenport, NY 11944-0848, USA.

**BENITO A, REGENMORTEL MHV VAN.**

Biosensor characterization of antigenic site A of foot-and-mouth disease virus presented in different vector systems. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 1998; 21 (2): 101-115. Biochemistry Laboratory, Universitat de Girona, 17071 Girona, Spain.

**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. *Veterinary Quarterly* 1998; 20 (supl 2): S6-S9. Pan American Foot-and-Mouth Disease Center (PAHO/WHO), Caixa Postal 589, 20.001, Rio de Janeiro, Brazil.

**BIGERIEGO P, ROSAS MF, ZAMORA E, MARTINEZ SALAS E, SOBRINO F.**

Heterotypic inhibition of foot-and-mouth disease virus infection by combinations of RNA transcripts corresponding to the 5' and 3' regions. *Antiviral Research* 1999; 44 (2): 133-141. Centro de Biología Molecular, Severo Ochoa (CSIC-UAM), 28049 Cantoblanco, Madrid, Spain.

**BLANCOU J.**

Histoire de l'épidémiologie des maladies animales transmissibles [History of transmissible animal diseases' epidemiology]. *Épidémiologie et Santé Animale* 1999; 36: 83-102. Office International des Epizooties, 12 rue de Prony, 75017 Paris, France.

**BREM JJ, PERILO OH, ROUX JP.**

Linfocitos "T" y respuesta humoral antiaftosa en bovinos con diferente disponibilidad de cobre-molibdeno. ["T" lymphocytes and humoral immune response to foot-and-mouth disease in cattle supplemented with different copper and molybdenum combinations]. *Revista de Medicina Veterinaria Buenos Aires* 1999; 80 (1): 14-18. Carrera del Investigador Científico del CONICET, Argentina.

**BROCCHI E, DIEGO MI, BERLINZANI A, GAMBA D, SIMONE F, DIEGO MI.**

Diagnostic potential of Mab-based ELISAs for antibodies to non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus to differentiate infection from vaccination. Veterinary Quarterly 1998; 20 (supl 2): S20-S24. Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell' Emilia, Brescia, Italy.

**BROWN F, BENKIRANE N, LIMAL D, HALIMI H, NEWMAN JFE, REGENMORTEL MHV VAN, BRIAND JP, MULLER S.**

Delineation of a neutralizing subregion within the immunodominant epitope (GH loop) of foot-and-mouth disease virus VP1 which does not contain the RGD motif. Vaccine 1999; 18 (1-2): 50-56. Plum Island Animal Disease Center, USDA/ARS, P.O. Box 848, Greenport, NY 11944-0848, USA

**CALLENS M, CLERCQ K de.**

Highly sensitive detection of swine vesicular disease virus based on a single tube RT-PCR system and DIG-ELISA detection. Journal of Virological Methods 1999; 77 (1): 87-99. Veterinary and Agrochemical Research Centre, Groeselenberg 99, B-1180, Brussels (Ukkel), Belgium.

**CALLENS M, CLERCQ K de, GRUIA M, DANES M.**

Detection of foot-and-mouth disease by reverse transcription polymerase chain reaction and virus isolation in contact sheep without clinical signs of foot-and-mouth disease. Veterinary Quarterly 1998; 20 (supl 2): S37-S40. Veterinary and Agricultural Research Centre (VAR), Groeselenberg 99, B-1180 Brussels (Ukkel), Belgium.

**CARRILLO C, BORCA M, MOORE DM, MORGAN DO, SOBRINO F.**

In vivo analysis of the stability and fitness of variants recovered from foot-and-mouth disease virus quasispecies. Journal of General Virology 1998; 79 (7): 1699-1706. Centro de Investigación en Sanidad Animal, INIA, Valdeolmos, 28130 Madrid, Spain.

**CARRILLO C, WIGDOROVITZ A, OLIVEROS JC, ZAMORANO PI, SADIR AM, GOMEZ N, SALINAS J, ESCRIBANO JM, BORCA MV.**

Protective immune response to foot-and-mouth disease virus with VP1 expressed in transgenic plants. Journal of Virology 1998; 72 (2): 1688-1690. Instituto de Virología, C.I.C.V., INTA-Castelar, Buenos Aires, Argentina.

**CASAS OLASCOAGA R, GOMES I, ROSENBERG FJ, AUGÉ DE MELLO P, ASTUDILLO V, MAGALLANES N.**

Fiebre aftosa. São Paulo: Atheneu; 1999.

**CHILLAUD T, BONJOUR P.**

Les méthodes pouvant remplacer ou compléter la surveillance par échantillonnage en santé animale. [Methods to replace or complete surveillance by sampling in animal health]. Épidémiologie et Santé Animale 1998; 34: 57-62. Service de l'information et des échanges internationaux, Office International des Epizooties (OIE), 12 rue de Prony, 75017 Paris, France.

**CHINSANGARAM J, BEARD C, MASON PW, ZELLNER MK, WARD G, GRUBMAN MJ.**

Antibody response in mice inoculated with DNA expressing foot-and-mouth disease virus capsid proteins. Journal of Virology 1998; 72 (5): 4454-4457. Plum Island Animal Disease Center, Agricultural Research Service, USDA, Greenport, NY 11944, USA.

**CHINSANGARAM J, PICCONE ME, GRUBMAN MJ.**

Ability of foot-and-mouth disease virus to form plaques in cell culture is associated with suppression of alpha/beta interferon. Journal of Virology 1999; 73 (12): 9891-9898. Plum Island Animal Disease Center, North Atlantic Area, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, P.O. Box 848, Greenport, NY 11944, USA.

**COLLEN T, BARON J, CHILDERSTONE A, CORTEYN A, DOEL TR, FLINT M, GARCIA-VALCARCEL M, PARKHOUSE RME, RYAN MD.**

Heterotypic recognition of recombinant FMDV proteins by bovine T-cells: the polymerase (P3Dpol) as an immunodominant T-cell immunogen. Virus Research 1998; 56 (2): 125-133. Department of Immunology, Institute for Animal Health, Ash Road, Pirbright, Surrey GU24 0NF, UK.

**DEKKER A.**

Inactivation of foot-and-mouth disease virus by heat, formaldehyde, ethylene oxide and gamma-radiation. Veterinary Record 1998; 143 (6): 168-169. Institute for Animal Science and Health, (ID-DLO) Research Branch Houtribweg, Houtribweg 39, PO Box 65 NL-8200 AB Lelystad, Netherlands.

**DEKKER A, GIJSSEN E.**

The possible use of native foot-and-mouth disease non-structural protein 3A in a serological screening test. Veterinary Quarterly 1998; 20 (supl 2): S27-S28. Department of Mammalian Virology, Institute for Animal Science and Health, Lelystad, Netherlands.

**DOMINGO E, VERDAGUER N, OCHOA WF, RUIZ JARABO CM, SEVILLA N, BARANOWSKI E, MATEU MG, FITA I, ZELL R, HAUSEN H zur.**

Biochemical and structural studies with neutralizing antibodies raised against foot-and-mouth disease virus. Virus Research 1999; 62 (2): 169-175. Centro de Biología Molecular 'Severo Ochoa', Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain.

**DONALDSON A.**

Airborne spread of foot-and-mouth disease. Microbiology Today 1999; 26 (3): 118-119. Pirbright Laboratory of the Institute for Animal Health, Woking, Surrey GU24 0NF, UK.

**DUNN CS, SAMUEL AR, PULLEN LA, ANDERSON J.**

The biological relevance of virus neutralisation sites for virulence and vaccine protection in the guinea pig model of foot-and-mouth disease. Virology 1998; 247 (1): 51-61. Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory, Ash Road, Pirbright, Woking, Surrey GU24 ONF, UK.

**ESCARMIS C, CARRILLO EC, FERRER M, ARRIAZA JFG, LOPEZ N, TAMI C, VERDAGUER N, DOMINGO E, FRANZE FERNANDEZ MT.**

Rapid selection in modified BHK-21 cells of a foot-and-mouth disease virus variant showing alterations in cell tropism. Journal of Virology 1998; 72 (12): 10171-10179. Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (CSIC-UAM), Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain.

**FARES MA, BARRIO E, BECERRA N, ESCARMIS C, DOMINGO E, MOYA A.**

The foot-and-mouth disease RNA virus as a model in experimental phylogenetics. International Microbiology 1998; 1 (4): 311-318. Department of Genetics, University of Valencia, Dr. Moliner, 50., 46100 Burjassot, Valencia. Spain.

**FELLU JX, BENITO A, OLIVA B, AVILES FX, VILLAVERDE**

A Conformational flexibility in a highly mobile protein loop of foot-and-mouth disease virus: distinct structural requirements for integrin and antibody binding. Journal of Molecular Biology 1998; 283 (2): 331-338. Institut de Biología Fonamental, Universitat Autònoma de Barcelona Bellaterra, 08193 Barcelona, Spain.

**FOSTER M, COOK A, CEDILLO L, PARKHOUSE RME.**

Serological and cellular immune responses to non-structural proteins in animals infected with FMDV. Veterinary Quarterly 1998; 20 (supl 2): S28-S30. Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory, Surrey GU24 0NF, UK.

**FREIBERG B, RAHMAN MM, MARQUARDT O.**

Genetical and immunological analysis of recent Asian type A and O foot-and-mouth disease virus isolates. Virus Genes 1999; 19 (3): 167-182. Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, D-72076 Tübingen, Paul-Ehrlich-Strasse 28, Germany.

**GUARNE A, TORMO J, KIRCHWEGER R, PFISTERMUELLER D, FITA I, SKERN T.**

Structure of the foot-and-mouth disease virus leader protease: a papain-like fold adapted for self-processing and eIF4G recognition. EMBO Journal 1998; 17 (24): 7469-7479. Centre d'Investigació i Desenvolupament (CSIC), Jordi Girona Salgado 18-26, E-08034 Barcelona, Spain.

**KITCHING RP.**

A recent history of foot-and-mouth disease. Journal of Comparative Pathology 1998; 118 (2): 89-108. Head, OIE/FAO World Reference Laboratory for Foot-and-Mouth Disease Virus, Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory, Ash Road, Pirbright, Woking, Surrey GU24 0NF, UK.

**KOKUHO T, WATANABE S, YOKOMIZO Y, INUMARU S.**

Production of biologically active, heterodimeric porcine interleukin-12 using a monocistronic baculoviral expression system. Veterinary Immunology and Immunopathology 1999; 72 (3-4): 289-302. Laboratory of Bioengineering, Department of Biological Product, National Institute of Animal Health 3-1-1 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki, 305-0856, Japan.

**LUBROTH J, LOPEZ A, RAMALHO AK, MEYER RF, BROWN F, DARSIE GC.**

Cattle response to foot-and-mouth disease virus nonstructural proteins as antigens within vaccines produced using different concentrations. Veterinary Quarterly 1998; 20 (supl 2): S13-S17. United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Services, National Veterinary Services Laboratories, Greenport, NY 11944, USA.

**MACKAY DKJ.**

Differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease: summary and conclusions of the Final Meeting of Concerted Action CT93 0909. Veterinary Quarterly 1998; 20(supl 2): S2-S5. Institute for Animal Health, Ash Road, Pirbright, Woking, Surrey GU24 ONF.

**MACKAY DKJ, FORSYTH MA, DAVIES PR, SALT JS.**

Antibody to the nonstructural proteins of foot-and-mouth disease virus in vaccinated animals exposed to infection. Veterinary Quarterly 1998; 20 (supl 2): S9-S11. Institute for Animal Health, Ash Road, Pirbright, Woking, Surrey GU24 0NF, UK.

**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. Veterinary Quarterly 1998; 20 (supl 2): S24-S26. Pan American Foot-and-Mouth Disease Center (PAHO/WHO), Caixa Postal 589, 20.001, Rio de Janeiro, Brazil.

**MARQUANT LE, GUIENNE B, REMOND M, COSQUER R, HUMBLOT P, KAISER C, LEBRETON F, CRUCIERE C, GUERIN B, LAPORTE J, THIBIER M.**

Exposure of in vitro-produced bovine embryos to foot-and-mouth disease virus. Theriogenology 1998; 50 (1): 109-116. UNCEIA, 13 Rue Jouet, BP 65, 94700 Maisons-Alfort, France.

**MARQUARDT O, HAAS B.**

Aims of the FMDV-specific RT-PCR as it is performed at the BFAV, Tuebingen laboratory. Veterinary Quarterly 1998; 20 (supl 2): S31-S32. Bundesforschungsanstalt fur Viruskrankheiten der Tiere, Paul-Ehrlich-Strasse 28, D 7400 Tubingen, Germany.

**MARQUARDT O, HAAS B.**

VP1-coding sequences of recent isolates of foot-and-mouth disease virus types A, O and Asia 1. Virus Genes 1998; 16 (2): 185-193. Bundesforschungsanstalt fur Viruskrankheiten der Tiere, Paul-Ehrlich-Strasse 28, D-72076 Tubingen, Germany.

**MARTIN MJ, NUNEZ JI, SOBRINO F, DOPAZO J.**

A procedure for detecting selection in highly variable viral genomes: evidence of positive selection in antigenic regions of capsid protein VP1 of foot-and-mouth disease virus. Journal of Virological Methods 1998; 74 (2): 215-221. TDI, Departamento de I + D, 28100 Alcobendas, Madrid, Spain.

**MASON PW, GRUBMAN MJ, CHINSANGARAM J.**

Protection of swine by live and inactivated vaccines prepared from a leader proteinase-deficient serotype A12 foot-and-mouth disease virus. Vaccine 1998; 16 (16): 1516-1522. USDA, ARS, NAA, Plum Island Animal Disease Center, P.O.Box 848, Greenport, NY 11944, USA.

**MAYR GA, CHINSANGARAM J, GRUBMAN MJ.**

Development of replication-defective adenovirus serotype 5 containing the capsid and 3C protease coding regions of foot-and-mouth disease virus as a vaccine candidate. Virology 1999; 263 (2): 496-506. Plum Island Animal Disease Center, USDA, ARS, NAA, PO Box 848, Greenport, New York 11944, USA.

**MEZENCIO JMS, BABCOCK GD, KRAMER E, BROWN F.**

Evidence for the persistence of foot-and-mouth disease virus in pigs. Veterinary Journal 1999; 157 (3): 213-217. Plum Island Animal Disease Center, P.O. Box 848, Greenport, NY 11944, USA.

**MEZENCIO JMS, BABCOCK GD, MEYER RF, LUBROTH J, SALT JS, NEWMAN JFE, BROWN F.**

Differentiating foot-and-mouth disease virus-infected from vaccinated animals with baculovirus-expressed specific proteins. Veterinary Quarterly 1998; 20 (supl 2): S11-S13. Plum Island Animal Disease Center, P. O. Box 848, Greenport, NY 11944, USA.

**MORALES MARIN LF.**

Balance del primer ciclo de vacunación contra la fiebre aftosa en el departamento de Antioquia. [Balance of the first vaccination cycle against foot-and-mouth disease in the Department of Antioquia]. Noticampo 1998; 8: 3-4. Seccional Antioquia, Chocó, Colombia.

**MOSS A, HAAS B.**

Comparison of the plaque test and reverse transcription tested PCR for the detection of FMDV in nasal swabs and probang samples. Journal of Virological Methods 1999; 80: 1, 59-67. Federal Research Centre for Virus Diseases of Animals, Paul-Ehrlich-Strasse 28, D-72076 Tübingen, Germany.

**NEFF S, CARVALHO DS, RIEDER E, MASON PW, BLYSTONE SD, BROWN EJ, BAXT B.**

Foot-and-mouth disease virus virulent for cattle utilizes the integrin alphavbeta3 as its receptor. Journal of Virology 1998; 72 (5): 3587-3594. Plum Island Animal Disease Center, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Greenport, NY 11944, USA.

**NUNEZ JI, BLANCO E, HERNANDEZ T, DOPAZO J, SOBRINO F.**

RT-PCR in foot-and-mouth disease diagnosis. Veterinary Quarterly 1998; 20 (supl 2): S34-S36. Tecnología para Diagnóstico e Investigación S.A. 28028, Madrid, Spain.

**NUNEZ JI, BLANCO E, HERNANDEZ T, GOMEZ TEJEDOR C, MARTIN MJ, DOPAZO J, SOBRINO F.**

A RT-PCR assay for the differential diagnosis of vesicular viral diseases of swine. Journal of Virological Methods 1998; 72 (2): 227-235. Tecnología para Diagnóstico e Investigación S.A., Alcobendas 28100, Madrid, Spain.

**PUPPI NL.**

La lucha contra la fiebre aftosa en la Argentina (revisión histórica). [The fight against foot-and-mouth disease in Argentina (historical review)]. Revista de la Facultad de Agronomía Universidad de Buenos Aires 1999; 18 (3): 185-190. Departamento de Economía, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Av. San Martín 4453, 1417 Buenos Aires, Argentina.

**RATISH G, VISWANATHAN S, SURYANARAYANA,VVS.**

C-terminal region of VP1 of selected foot-and-mouth disease virus serotypes: expression in E. coli and affinity purification. Acta Virológica 1999; 43 (4): 205-211. Indian Veterinary Research Institute, Hebbal, Bangalore 560 024, India.

**REID SM, ANSELL DM, FERRIS NP, HUTCHINGS GH, KNOWLES NJ, SMITH AW.**

Development of a reverse transcription polymerase chain reaction procedure for the detection of marine caliciviruses with potential application for nucleotide sequencing. Journal of Virological Methods 1999; 82 (1): 99-107.Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory, Pirbright, Woking, Surrey, GU24 ONF, UK.

**RODRIGUES TORRES JG, LOPEZ INZAURRALDE A.**

Eradicación de la fiebre aftosa en las Américas. [Eradication of foot and mouth disease in the Americas]. Revista Brasileira de Medicina Veterinária 1998; 20 (6): 230-231. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. Av.Presidente Kennedy, 7778 Duque de Caxias CEP: 25040-000 Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

**RUST RC, OCHS K, MEYER K, BECK E, NIEPMANN M.**

Interaction of eukaryotic initiation factor eIF4B with the internal ribosome entry site of foot-and-mouth disease virus is independent of the polypyrimidine tract-binding protein. Journal of Virology 1999; 73 (7): 6111-6113. Institute of Biochemistry, D-35392 Giessen, Germany.

**SAHA SN, NATARAJAN C.**

Development and characterization of monoclonal antibodies to foot-and-mouth disease virus type 'C'. Indian Journal of Experimental Biology 1998; 36 (12): 1258-1263. Indian Veterinary Research Institute, Bangalore Campus, PO HA Farm, Bangalore 560 024, India.

**SAMINA I, ZAKAY RONES Z, PELEG BA.**

Homologous and heterologous antibody response of cattle and sheep after vaccination with foot-and-mouth disease and influenza viruses. Vaccine 1998; 16 (6): 551-557. State Laboratory for Vaccine Control, Kimron Veterinary Institute, POB 12, Beit Dagan, 50250 Israel.

**SAMINA I, ZAKAY RONES Z, WELLER JI, PELEG BA.**

Host factors affecting the homologous and heterologous immune response of cattle to FMDV: genetic background, age, virus strains and route of administration. Vaccine 1998; 16 (4): 335-339. State Laboratory for Vaccine Control, Kimron Veterinary Institute, P.O.B. 12, 50250 Beit Dagan, Israel.

**SANZ PARRA A, BLASCO R, SOBRINO F, LEY V.**

Analysis of the B and T cell response in guinea pigs induced with recombinant vaccinia expressing foot-and-mouth disease virus structural proteins. Archives of Virology 1998; 143 (2): 389-398. Centro de Investigación en Sanidad Animal, INIA, 28130, Valdeolmos, Madrid, Spain.

**SANZ PARRA A, SOBRINO F, LEY V.**

Infection with foot-and-mouth disease virus results in a rapid reduction of MHC class I surface expression. Journal of General Virology 1998; 79 (3): 433-436. Centro de Investigación en Sanidad Animal, INIA, Valdeolmos, 28130 Madrid, Spain.

**SCHERBAKOV A, LOMAKINA N, DRYGIN V, GUSEV A.**

Application of RT-PCR and nucleotide sequencing in foot-and-mouth disease diagnosis. Veterinary-Quarterly 1998; 20 (supl 2): S32-S34. All-Russian Research Institute for Animal Health, Vladimir, Russia.

**SERRÃO UM.**

Programa nacional de controle e erradicação da febre aftosa. [National programme for the control and eradication of foot-and-mouth disease]. Revista Brasileira de Medicina Veterinária 1999; 21 (6): 229-231. Membro da Academia Brasileira de Medicina Veterinária, Av. Presidente Vargas, 446 - Gr. 1004 - CEP 20085-900, Rio de Janeiro, Brazil.

**SMITSAART EN, ZANELLI M, RIVERA I, FONDEVILA N, COMPAIRE D, MARADEI E, BIANCHI T, O'DONNELL V, SCHUDEL AA.**

Assessment using ELISA of the herd immunity levels induced in cattle by foot-and-mouth disease oil vaccines. Preventive Veterinary Medicine 1998; 33 (1-4): 283-296. Instituto de Virología, Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias, INTA, Castelar, Morón CC 77 (1708), Pcia, Buenos Aires, Argentina.

**SOBRINO F, BLANCO E, GARCIA BRIONES M, LEY V.**

Synthetic peptide vaccines: foot-and-mouth disease virus as a model. In: Brown F, Hendriksen CFM, Serasirdic C, eds. Alternative to animals in the development and control of biological products for human and veterinary use. Basel: Karger; 1999. p. 39-43 (Developments in biological standardization; vol 101). Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), Cantoblanco, Madrid, Spain.

**SORENSEN KJ, HANSEN CM, MADSEN ES, MADSEN KG.**

Blocking ELISAs using the FMDV non-structural proteins 3D, 3AB, and 3ABC produced in the baculovirus expression system. Veterinary Quarterly 1998; 20 (supl 2): S17-S20. Danish Veterinary Institute for Virus Research, Lindholm, DK4771 Kalvehave, Denmark.

**SUAREZ VH, FORT MC, LORENZO RM, BUSETTI MR, ROBILO B.**

Respuesta inmunológica inespecífica en terneros parasitados por nematodos. [Non-specific immune responses in calves infected with nematodes]. Veterinaria Argentina 1999; 16 (159): 663-671. INTA, EEA-Anguil, CC 11, 6326 Anguil, La Pampa, Argentina.

**SUTMOLLER P.**

Risk of disease transmission by llama embryos. Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Épizooties 1999; 18 (3): 719-728. Animal Health Consultant, 2430 Crowncrest Drive, Richmond, VA 23233, USA.

**VERDAGUER N, SCHOEHN G, OCHOA WF, FITA I, BROOKES S, KING A, DOMINGO E, MATEU MG, STUART D, HEWAT EA.**

Flexibility of the major antigenic loop of foot-and-mouth disease virus bound to a Fab fragment of a neutralising antibody: structure and neutralisation. Virology 1999; 255 (2): 260-268. Departamento de Biología Molecular y Celular, CID (CSIC), Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain.

**VERDAGUER N, SEVILLA N, VALERO ML, STUART D, BROCCHI E, ANDREU D, GIRALT E, DOMINGO E, MATEU MG, FITA I.**

A similar pattern of interaction for different antibodies with a major antigenic site of foot-and-mouth disease virus: implications for intratypic antigenic variation. Journal of Virology 1998; 72 (1): 739-748. Centre de Investigacio i Desenvolupament (CISC), Jordi Girona 6, 08028 Barcelona, Spain.

**VILLAVERDE A, FELIU JX, ARIS A, HARBOTTLE RP, BENITO A, COUTELLE C.**

A cell adhesion peptide from foot-and-mouth disease virus can direct cell targeted delivery of a functional enzyme. Biotechnology and Bioengineering 1998; 59 (3): 294-301. Institut de Biología Fonamental and Departament de Genetica i Microbiología, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, 08193 Barcelona, Spain.

**WACHSMAN MB, CASTILLA V, COTO CE.**

Inhibition of foot and mouth disease virus (FMDV) uncoating by a plant-derived peptide isolated from Melia azedarach L leaves. Archives of Virology 1998; 143 (3): 581-590. Laboratorio de Virología, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria, Buenos Aires, Argentina.

**WIGDOROVITZ A, ZAMORANO P, BORCA MV, SADIR AM.**

Modulation of the antigen presentation activity in foot-and-mouth disease virus (FMDV) vaccines by two adjuvants: avridine and a water soluble fraction of Mycobacterium sp. Vaccine

1998; 16 (17): 1627-1632. Instituto de Virología, C.I.C.V., INTA-Castelar, CC.77, Moron, (1708) Poia, Buenos Aires, Argentina.

**ZAMORANO PI, WIGDOROVITZ A, FILGUEIRA DMP, ESCRIBANO JM, SADIR AM, BORCA MV.**

Induction of anti-foot-and-mouth disease virus T and B cell responses in cattle immunized with a peptide representing ten amino acids of VP1. Vaccine 1998; 16 (6): 558-563. Instituto de Virología, C.I.C.V., INTA-Castelar, CC77, Moron, (1708) Pcia., Buenos Aires, Argentina.

**WIGDOROVITZ A, PEREZ FILGUEIRA DM, ROBERTSON N, CARRILLO C, SADIR AM, MORRIS TJ, BORCA MV.**

Protection of mice against challenge with foot-and-mouth disease virus (FMDV) by immunization with foliar extracts from plants infected with recombinant tobacco mosaic virus expressing the FMDV structural protein VP1. Virology 1999; 264 (1): 85-91. Instituto de Virología, CICV, INTA-Castelar, CC77, Morón, 1708 Pcia. de Buenos Aires, Argentina.

**Zoonosis/Zoonoses**

**ALMEIDA LP, REIS DO.**

Brucelose e bursite cervical em bovinos: uma revisão. [Brucellosis and supraspinous bursitis in bovine: a review]. Revista Brasileira Medicina Veterinária 1999; 21 (4): 149-152. DNS-Universidade Federal de Viçosa, Av. PH Rolfs s/n, Campus Universitário, 36571-000, Viçosa, MG, Brazil.

**ALMOND JW, SPRATT BG.**

Bovine spongiform encephalopathy and new variant Creutzfeldt-Jakob disease. Resurgent emergent infectious diseases. British Medical Bulletin 1998; 54 (3): 749-759. School of Animal and Microbial Sciences, University of Reading, Reading, RG6 6AJ, UK.

**AUSTIN CC.**

Bats and rabies. Journal of the American Veterinary Medical Association 1998; 213 (9): 1323-1325. Illinois Department of Public Health, Division of Infectious Diseases, 525 W Jefferson St. Springfield, IL 62761, USA.

**CHOMEL BB.**

New emerging zoonoses: a challenge and an opportunity for the veterinary profession. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 1998; 21 (1): 1-14. Department of Population Health and Reproduction, School of Veterinary Medicine, University of California, Davis, CA 95616, USA.

**COSIVI O, MESLIN FX.**

Future trends in veterinary public health. Bulletin World Veterinary Association 1999; 16 (2): 68-69. Animal and Food-related Public Health Risks, Department of Communicable Disease Surveillance and Response, World Health Organization, Geneva, Switzerland.

**DOHOO IR, MCDONELL WN, RHODES CS, ELAZHARY YL.**

Veterinary research and human health. Canadian Veterinary Journal 1998; 39 (9): 548-556. Atlantic Veterinary College, University of Prince Edward Island, 550 University Avenue, Charlottetown, Prince Edward Island C1A 4P3, Canada.

**HIGGINS R.**

Infections à caractère zoonotique incertain. [Infections of uncertain zoonotic origin]. Les zoonoses. Médecine Vétérinaire du Quebec 1999; 29 (1): 29, 32-35. Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000, Saint-Hyacinthe, Quebec J2S 7C6, Canada.

**HOAR BR, CHOMEL BB, ARGAEZ-RODRIGUEZ FJ, COLLEY PA.**

Zoonoses and potential zoonoses transmitted by bats. Journal of the American Veterinary Medical Association 1998; 212 (11): 1714-1720, World Health Organization, Department of Population Health and Reproduction, School of Veterinary Medicine, University of California, Davis, CA 95616, USA.

**MANTOVANI A, PARODI P, POGLAYEN G.**

Veterinary Urban Hygiene in developing countries. Giornale Italiano di Medicina Tropicale 1999; 4 (1-2): 21-29. WHO/FAO Collaborating Centre for Research and Training in Veterinary Public Health, Laboratorio di Parassitologia, Istituto Superiore di Sanita, Rome, Italy.

## **Boletín del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa**

### **Invitación a los autores**

El BOLETÍN del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa es una revista del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS). En ella se publican trabajos que se juzgan de interés para las actividades relacionadas con los programas de prevención o de lucha contra la fiebre aftosa y otras enfermedades virales de los animales. Los autores que deseen publicar sus trabajos en esta revista deberán someterlos a la consideración del Comité Editorial, en cualquiera de los siguientes formatos o presentaciones:

*Trabajo:* Investigación original, presentada en forma completa, con las divisiones tradicionales: Introducción; Material y Métodos; Resultados; Discusión; Conclusiones; Referencias y Agradecimientos. Además, debe tener un Resumen de no más de 250 palabras.

*Comunicación breve:* Trabajo científico completo, de no más de 6 ó 7 páginas. Los resultados y discusiones pueden presentarse juntamente con los datos y 1 ó 2 cuadros como máximo.

*Comunicación preliminar:* Pequeño resumen de un trabajo que está en ejecución; de 3 ó 4 páginas de extensión y con no más de 2 cuadros.

*Trabajo de revisión:* Formato flexible.

*Idiomas:* Los artículos pueden ser en español, inglés o portugués y se publicarán solamente en el idioma original entregado por los autores. Los resúmenes serán traducidos y publicados en los otros dos idiomas. La versión en inglés de los artículos en español o portugués se publicará solamente cuando sea entregada por los autores.

### **Instrucciones a los autores**

1. Todos los trabajos que se presenten para su publicación en el BOLETÍN deben estar escritos a máquina, a doble espacio, en un sola cara de papel, tamaño carta (28 x 22cm). El original se acompañará de tres fotocopias y de un disquete de computadora con el texto y los cuadros en cualquier software de PC, preferiblemente Microsoft Word.
2. En una hoja separada se detallarán: Apellido y nombre o iniciales del autor (o autores), cargo oficial y nombre de la institución (si pertenece a alguna) y dirección.
3. Las ilustraciones y cuadros, numerados con números arábigos, con sus respectivas leyendas y títulos, se incluirán en páginas aparte, numerados en forma consecutiva y agrupados al final del trabajo, con indicación del lugar donde deben ser incluidos.
4. Las referencias citadas deben presentarse en lista separada, por orden alfabético y con los números que les corresponden en el texto.
5. El Editor responsable se reserva el derecho de aceptar o rechazar la publicación de un trabajo, así como de realizar cualquier modificación editorial, como ser: la condensación u omisión de parte del texto, cuadros, ilustraciones o anexos. Los originales no se devuelven en ningún caso.
6. Publicado el trabajo, cada autor recibirá un ejemplar del volumen correspondiente del Boletín.

**Editor responsable:** Dr. Eduardo Correa Melo, Director

## Pan American Foot-and-Mouth Disease Center Bulletin

### **Invitation to Contributors**

The BOLETIN is a journal of the Pan-American Foot-and-Mouth Disease Center (PAHO/WHO). It publishes articles relating to all aspects of work in laboratory, field and program activities of foot-and-mouth disease and other viral diseases in animals. The Director invites contributors to submit their work to the Editorial Committee in the most appropriate of the following formats:

*Article:* full-length scientific work, reporting on original research, with traditional divisions of Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusions, References and Acknowledgments. An abstract of no more than 250 words should accompany the article.

*Brief Report:* short (6-7 typewritten pages) complete scientific work: results and discussion can be presented with the data, which should be limited to 2 tables.

*Preliminary Communication:* short summary of work in progress; 3-4 pages; maximum of 2 tables.

*Review Article:* on both general and specific topics, flexible format.

*Languages:* Articles may be in Spanish, English or Portuguese and will be published only in the original language submitted by the authors. Summaries will be translated and published in the other two languages. The English version of articles in Spanish or Portuguese will be published only when submitted by the authors.

### **Instructions to Authors**

1. All manuscripts presented to the BOLETIN should be typewritten and double-spaced on one side of 28 x 22 cm paper. The original manuscript should be accompanied by three photocopies and a computer diskette containing the text and tables in any PC word-processing software, though Microsoft Word is preferred.
2. Author's name, title, institution and address should be given on a separate sheet.
3. Figures and tables (arabic numbers) with appropriate captions and titles should be included on separate pages, numbered consecutively and attached at the end of the text with an indication of where they belong.
4. References cited should be listed separately in alphabetical order with appropriate reference numbers in the text.
5. The Editor reserves the right to accept or reject any Manuscript which is submitted, with the understanding that it is subject to editorial revision, including, where necessary, condensation of the text and omission of tabular and illustrative material, etc.
6. Authors will receive the corresponding Boletin.

**Editor:** Dr. Eduardo Correa Melo, Director

Editado en el

**CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA (OPS/OMS)**

Caixa Postal 589, 20001-970 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

**<http://www.panaftosa.org.br>**

Agosto de 2002

## **Acerca de PANAFTOSA – OPS/OMS**

El Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (PANAFTOSA) de la Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS), es un Centro Internacional de la División de Prevención y Control de Enfermedades/Programa de Salud Pública Veterinaria, que tiene como misión:

Cooperar con los países de las Américas en la organización, desarrollo y fortalecimiento de los programas nacionales y regionales de prevención, control y erradicación de la Fiebre Aftosa y de control y eliminación de las zoonosis de impacto en la salud humana y en la producción animal.



**Organización Panamericana de la Salud  
Organización Mundial de la Salud**

### **CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA**

Av. Pres. Kennedy, 7778 ■ São Bento  
Duque de Caxias ■ RJ, Brasil ■ CEP 25040-000  
Tel.: 0055(21) 671-3128 ■ Fax: 0055(21) 671-2387  
[www.panaftosa.org.br](http://www.panaftosa.org.br) ■ e-mail:[panaftosa.ops-oms.org](mailto:panaftosa.ops-oms.org)