

EL USO DEL ANTIGENO ASOCIADO A LA INFECCION VIRAL (VIA)
EN LA DETECCION DE GANADO EXPUESTO AL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA
THE USE OF VIRUS-INFECTION-ASSOCIATED ANTIGEN (VIA) IN THE
DETECTION OF CATTLE EXPOSED TO FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS

Albino Alonso Fernández, Paulo Augé de Mello,
Ivo Gomes, Félix Rosenberg*

COMUNICACION BREVE

BRIEF REPORT

En un trabajo que publicamos en este mismo número (1) se describe un método simplificado para preparar el antígeno asociado a la infección viral (VIA) para la identificación de animales infectados con el virus de la fiebre aftosa. Este antígeno fue usado en la prueba de doble difusión en agar como lo describieron McVicar y Suttmoller (2). Cuatro estudios preliminares se llevaron a cabo con sueros de diferentes grupos de animales para probar el valor de este antígeno para detectar infecciones de fiebre aftosa (FA).

a) Primero, 28 sueros fueron obtenidos de animales no vacunados en rebaños donde no se habían observado nunca signos clínicos de la enfermedad, aún cuando los animales procedían de áreas endémicas de fiebre aftosa. Solamente uno de los 28 sueros dio resultado positivo a la prueba de VIA, lo que posiblemente refleja una baja tasa de infección en estos animales.

b) En una segunda prueba, 47 animales fueron inyectados con virus aftoso por vía intradermolingual. Antes de la inoculación se investigó el VIA en los sueros con resultado negativo, pero tanto a los 7 días como a los 21 días después de la inoculación los 47 sueros dieron resultados positivos. Estos resultados son similares a los obtenidos por McVicar y Suttmoller (2).

A companion paper (1) described a simplified method for preparing virus-infection-associated (VIA) antigen for the identification of cattle infected with foot-and-mouth disease (FMD). This antigen was used with the agar-gel double diffusion test as described by McVicar and Suttmoller (2). Four preliminary studies were carried out with sera from different groups of cattle to test the value of the antigen in detecting FMD infections.

a) First, 28 sera were obtained from unvaccinated cattle in herds where clinical signs of the disease had never been observed. However, in the areas from which the cattle originated, FMD was endemic. Only one of the 28 sera gave a positive result in the VIA test, which possibly reflected the low infection rate of these cattle.

b) In a second test, 47 cattle were given intradermolingual FMDV inoculations. VIA tests on the sera before inoculation were negative, but at both 7 and 21 days post-inoculation all 47 sera gave positive results. These results are similar to those obtained by McVicar and Suttmoller (2).

c) A third test was made with sera from 50 animals vaccinated with three types of vaccine: inactivated with formaldehyde, inactivated with acetyleneimine (AEI) and

* Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, Caixa Postal 589, ZC-00, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

* Pan American Foot-and-Mouth Disease Center - Caixa Postal 589, ZC-00, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

c) Una tercera prueba se hizo con sueros de 50 animales vacunados con tres tipos de vacuna: inactivada con formaldehído, inactivada con acetiltilenimina (AEI) y de virus vivo modificado. La Tabla 1 resume estos resultados. Veintiún días después de la vacunación, los anticuerpos contra el VIA fueron

modified live virus vaccine. Table 1 summarizes the results. Twenty-one days post-vaccination, antibodies against VIA were detected in 5 of the 18 cattle with the formalin-inactivated vaccine, in none of the 16 cattle with AEI vaccine, and in 8 of the 16 cattle with modified-live-virus vaccine.

TABLA 1 - *Presencia de anticuerpos anti-VIA en bovinos vacunados con vacunas inactivadas con formol o AEI y de virus vivo modificado (VVM).*

TABLE 1 - *Presence of VIA antibodies in cattle vaccinated with formalin or AEI-inactivated vaccine or with modified live virus vaccine (MLV).*

Vacunas Vaccines	Días postvacunación Days post-vaccination		Días postcomprobación Days post-challenge
	0	21	21
Formol	0/18*	5/18	NT
AEI	0/16	0/16	10/16
VVM (MLV)	0/16	8/16	16/16

* Número de positivos/número de bovinos testados.

Number of positives/number of cattle tested.

NT = No testado/Not tested.

detectados en 5 de 18 animales con la vacuna inactivada con formol, en ninguno de los 16 animales con vacuna inactivada con AEI y en 8 de 16 animales inoculados con vacuna de virus vivo modificado.

En ese momento, los 32 animales de los últimos dos grupos fueron inoculados con virus aftoso por vía intradermolingual. Veintiún días después, 10 de los 16 que habían sido vacunados con vacuna inactivada con AEI tenían una reacción positiva a la prueba de VIA, lo mismo que ocurrió con los 16 inoculados con vacuna de virus vivo modificado.

Estos resultados indican que las vacunas inactivadas con formalina pueden haber contenido virus que replicó en los animales vacunados aún cuando no le hubieran causado signos clínicos de la enfermedad y las pruebas de inocuidad de la vacuna habían sido

At this point, the 32 cattle of the latter two groups were inoculated intradermolingually with FMDV. Twenty-one days later, 10 of the 16 AEI-vaccine cattle had a positive reaction in the VIA test, as did all of the 16 modified-live-virus cattle.

These results indicate that vaccines inactivated with formalin could have contained virus which replicated in the vaccinated cattle, even though it did not cause clinical signs of the disease and inocuity tests of the vaccine had been negative. The high proportion of cattle with antibodies against VIA after vaccination with modified live virus indicates that the vaccine virus multiplied. The appearance of antibodies against VIA shortly after intradermal inoculation of virus confirms the observations of McVicar and

negativas. La alta proporción de animales con anticuerpos contra el VIA después de la vacunación con vacuna de virus vivo modificado indica que el virus de la vacuna se había multiplicado. La aparición de anticuerpos contra el VIA poco tiempo después de la inoculación por vía intradermolingual del virus confirma las observaciones de McVicar y Suttmoller (3) que la replicación de virus puede ocurrir en animales vacunados.

d) La última prueba se hizo con 12 animales que habían sido mantenidos en aislamiento por más de un año. A intervalos de un mes los sueros habían sido probados para comprobar la ausencia de anticuerpos neutralizantes de la FA. En ningún caso se pudo aislar virus del líquido esófago faríngeo (EF) aún cuando éste fue examinado en varias ocasiones. Estos animales contrajeron la enfermedad, probablemente por exposición al virus (subtipo O₁) de animales enfermos de un establecimiento vecino.

La historia de la enfermedad y el esquema de muestreo se resumen en la Tabla 2. La infectividad del líquido EF fue investigada por técnicas ya descritas (4, 5). Los anticuerpos del suero fueron medidos por pruebas de seroprotección en ratón lactante (6), y los resultados se expresan como el Índice de Seroprotección en ratón (ISP).

El novillo nº 1 fue el primer animal que mostró signos clínicos (día 0). Un total de siete animales contrajeron la enfermedad en un período de 17 días. Las muestras de suero fueron colectadas de todos los animales excepto del novillo nº 1 en la primera semana, y sólo el novillo nº 8 tuvo niveles significativos de anticuerpos (ISP 3,2). Fue también el único animal positivo en las pruebas de VIA. Los líquidos EF no fueron colectados en este día de los animales clínicamente enfermos (nºs 1-3), pero el virus no pudo ser aislado de ninguna de las muestras colectadas de los otros animales.

Todos los líquidos EF examinados contenían virus en la segunda semana después

Suttmoller (3) that virus replication can occur in vaccinated animals.

d) The final test involved 12 cattle that had been kept in isolation for over a year. At monthly intervals their sera had been tested for the absence of FMDV neutralizing antibodies. No FMDV had ever been isolated from their oesophageal-pharyngeal (OP) fluid when tested on several occasions. These animals did, however, contract the disease probably, by exposure to the virus (subtype O₁) from diseased cattle in a neighboring barn.

The disease history and sampling scheme are summarized in Table 2. Infectivity of the OP fluid was carried out by techniques described (4, 5). Serum antibodies were measured with the serum protection test in suckling mice (6), and the results expressed as the Mouse Protection Index (MPI).

Steer No. 1 was the first animal showing clinical signs (day 0). A total of seven cattle contracted the disease over a period of 17 days. Serum samples were collected from all cattle except for Steer No. 1 in the first week, and only Steer No. 8 had significant antibodies (MPI 3.2). It was also the only positive animal in the VIA test. OP fluids were not collected on this day from the clinically diseased cattle (Nos. 1-3), but virus could not be isolated from any of the samples collected from the other animals.

All of the tested fluids contained virus the second week after the outbreak. Thus, five of the twelve cattle became infected sub-clinically, as confirmed by later increases of serum antibody titers.

These 12 cattle were studied for the following 15 months. Virus was isolated from most of the cattle for four months, and as long as eight months from the OP fluid of Animal No. 11. With the exception of No. 9, all cattle showed an increase in circulating protective antibodies. In several animals the mouse protection index began to decline between the second and fourth month, and by

TABLA 2 - Aislamiento de virus aftoso tipo O en líquido EF,
anticuerpos anti-VIA e ISP en bovinos infectados.

TABLE 2 - Isolation of type O FMD virus from OP fluid,
VIA antibodies, and MPI in infected cattle.

Animal Nº	Signos clínicos días postcontacto Clinical signs days post-contact	Prueba Test	Semanas postcontacto/Weeks post-contact									
			1	2	3	4	8	20	35	55	70	
1	0	EF/OP	NT	NT	NT	NT	-	-	-	-	-	
		VIA	NT	+	+	-	+	-	-	-	-	
		ISP/MPI	NT	4.8	4.8	6.0	3.1	1.7	1.7	1.0	0.5	
2	3	EF	0.7	+	NT	NT	-	-	-	-	NT	
		VIA	NT	+	+	-	+	+	+	+	+	
		ISP	NT	6.0	6.0	6.0	6.0	4.7	5.2	4.3	3.6	
3	6	EF	0.0	NT	NT	NT	+	+	-	-	NT	
		VIA	NT	+	+	+	+	+	+	+	+	
		ISP	NT	4.0	4.8	4.8	4.8	2.8	1.2	1.0	1.2	
4	8	EF	0.6	+	NT	NT	+	+	-	-	NT	
		VIA	NT	-	+	+	+	+	+	+	+	
		ISP	NT	0.8	5.2	6.2	6.2	5.6	5.7	6.0	6.0	
5	10	EF	0.0	+	NT	NT	+	+	-	-	NT	
		VIA	NT	-	+	+	+	+	+	+	+	
		ISP	NT	0.7	3.2	5.7	4.2	5.4	2.5	2.3	1.5	
6	10	EF	0.0	NT	NT	NT	+	+	-	-	NT	
		VIA	NT	-	+	+	+	+	-	-	-	
		ISP	NT	0.0	4.3	4.8	3.0	1.2	0.6	1.1	2.1	
7	17	EF	1.0	+	+	+	-	-	-	-	NT	
		VIA	NT	-	+	+	+	+	+	-	-	
		ISP	NT	0.4	4.2	4.8	4.4	1.7	0.7	0.7	0.2	
8	-	EF	3.2	+	+	+	-	-	-	-	NT	
		VIA	NT	+	+	+	+	+	+	-	-	
		ISP	NT	4.2	3.8	3.8	3.8	3.2	2.5	2.0	2.1	
9	-	EF	0.0	+	+	+	+	+	-	-	NT	
		VIA	NT	-	+	+	+	+	-	-	-	
		ISP	NT	0.5	0.9	1.4	1.4	1.2	1.4	1.1	1.5	
10	-	EF	0.2	+	+	+	+	+	-	-	NT	
		VIA	NT	-	-	-	-	-	-	-	M	
		ISP	NT	0.4	3.5	4.2	4.5	4.7	4.4	5.7	NT	
11	-	EF	0.3	+	+	+	+	+	+	-	NT	
		VIA	NT	-	+	+	+	+	+	+	-	
		ISP	NT	0.7	3.1	3.7	2.5	2.3	0.9	0.7	1.7	
12	-	EF	0.6	+	+	+	+	+	-	-	NT	
		VIA	NT	-	+	+	+	+	+	+	+	
		ISP	NT	0.0	1.3	3.3	4.2	4.0	1.0	1.8	1.6	

Leyenda/Legend

- + = Positivo/Positive.
 - = Negativo/Negative.
 EF/OP = Muestra esofágico-faríngea/Oesophageal-pharyngeal sample.
 VIA = Anticuerpos anti-VIA/VIA antibodies.
 ISP/MPI = Índice seroprotección/Mouse Protection Index.
 M = Murió 400 días postcontacto/Died 400 days post-contact.
 NT = No testado/Not tested.

del brote. Por tanto, cinco de los doce animales resultaron infectados en forma subclínica como fue confirmado por el posterior incremento de los títulos de anticuerpos en el suero.

Estos 12 animales fueron estudiados durante los 15 meses siguientes. El virus fue aislado del líquido EF de la mayoría de los animales durante cuatro meses, y hasta ocho meses del animal nº 11. Con la excepción del nº 9, todos los animales mostraron un incremento de los anticuerpos protectores circulantes. En varios animales el ISP comenzó a declinar entre el segundo y el cuarto mes y en el octavo mes el ISP de 7 de los 12 animales había caído por debajo del nivel de protección (<2) (6).

Todos los animales desarrollaron anticuerpos precipitantes contra el VIA con la excepción del nº 10, aún cuando este era un portador de virus hasta cuatro meses y mantuvo altos niveles de ISP a lo largo de todo el experimento. Ninguna relación se encontró entre la persistencia de anticuerpos contra el VIA y el aislamiento del virus del líquido EF, ni tampoco entre los títulos de ISP y la presencia o ausencia de signos clínicos de la enfermedad.

Algunas de las observaciones mencionadas deben ser tomadas en cuenta cuando se utilizan estas pruebas en programas de vigilancia epidemiológica, especialmente cuando estén involucrados animales que no tengan historia reciente de enfermedad clínica de FA. En este aspecto podemos notar la ausencia de formación de anticuerpos contra el VIA en el animal nº 10 y la presencia de anticuerpos VIA en el nº 9, que había tenido un bajo nivel de ISP.

Por lo tanto, podemos concluir que, en general, los anticuerpos contra el VIA persisten mucho más que el virus en la faringe, por lo menos tal como se puede detectar por los métodos corrientes, y que la existencia de anticuerpos contra el VIA en rebaños de bovinos indica un contacto previo con el virus de la FA.

the eighth month the MPI of 7 of the 12 animals had fallen below the protective level (<2) (6).

All animals developed precipitating antibodies against VIA with the exception of No. 10, even though it was a virus carrier up to four months and maintained high levels of MPI throughout the experiment. No relationship was noted between the persistence of antibodies against VIA and the isolation of virus of the OP fluid, nor between titers of the MPI and the presence or absence of clinical signs of the disease.

Some of the above observations should be taken into account when these tests are used in epidemiological surveys, especially when they deal with animals which do not have a recent history of clinical FMD. In this regard we may note the absence of formation of antibodies against VIA in Animal No. 10 and the presence of VIA antibodies in No. 9, which had a low MPI.

We may conclude that in general antibodies against VIA persist longer than the virus in the pharynx, at least as detected by current methods, and that the existence of antibodies against VIA in a cattle herd indicates previous experience with FMD virus.

REFERENCIAS - REFERENCES

1. ALONSO FERNANDEZ, A.; SONDAHL, MAGNUS S.: Preparación y concentración de los antígenos 140 S, 12 S y VIA del virus de la fiebre aftosa. *Bltm Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 17-18.
2. McVICAR, J.W., SUTMOLLER, P.: Foot-and-mouth disease: The agar gel diffusion precipitation test for antibody to virus-infection-associated (VIA) antigen as a tool for epizootiologic surveys. *Am. J. Epidem.* 92 (4): 273-278, 1970.
3. SUTMOLLER, P.; McVICAR, J.W.; COTTRAL, G.E.: The epidemiological importance of foot-and-mouth disease carriers. I. Experimentally produced foot-and-mouth disease carriers in susceptible and immune cattle. *Arch. ges. Virusforsch.* 23 (3): 227-235, 1968.
4. AUGÉ de MELLO, P.; HONIGMAN, M.N.; FERNANDES, M.V.; GOMES, I.: Further information on the survival of modified foot-and-mouth disease virus in cattle. *Bull. Off. int. Epizoot.* 73 (5-6): 489-505, 1970.
5. SUTMOLLER, P.; COTTRAL, G.E.: Improved techniques for the detection of foot-and-mouth disease virus in carrier cattle. *Arch. ges. Virusforsch.* 21 (2), 170-177, 1967.
6. CUNHA, R.; BAPTISTA, J.J.A.; SERRÃO, U.M.; TORTURELLA, I.: El uso de los ratones lactantes en la evaluación de los anticuerpos contra el virus de la fiebre aftosa y su significación inmunológica. *Gac. vet., B. Aires* 19 (110): 243-267, 1957.