

---

# **BOLETIN**

## **del centro panamericano de fiebre aftosa**

---

**Nº 55, enero-diciembre 1989**  
**No. 55, January-December 1989**

### **contenido**

### **contents**

**p.**

<b>La vacunación de bovinos jóvenes con una vacuna antiaftosa de adyuvante oleoso . . . . .</b>	<b>3</b>
<b>The vaccination of young cattle with an oil adjuvant foot-and-mouth disease vaccine . . . . .</b>	<b>9</b>
— Paulo Augé de Mello, Ivo Gomes, Hans G. Bahneemann	
<b>Aplicación de la técnica inmunoenzimática (ELISA) para el diagnóstico de los virus de la fiebre aftosa y estomatitis vesicular en comparación con la prueba de fijación del complemento . . . . .</b>	<b>15</b>
<b>Application of enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of foot-and-mouth disease virus and vesicular stomatitis in comparison with the complement fixation . . . . .</b>	<b>21</b>
— M.P.D. Gomes, M.S. Söndahl, M.A. Martins, R. Casas Olascoaga, A. Alonso F.	
<b>Identificación de anticuerpos de la lengua azul por la técnica de inmunodifusión en gel de agar . . . . .</b>	<b>27</b>
<b>Identification of bluetongue antibodies by the technique of immunodiffusion in agar gel . . . . .</b>	<b>31</b>
— Rossana Allende S., Gonçala M. Arita, Magnus S. Söndahl, Albino Alonso F.	

<b>Desarrollo de un método más simple y rápido para el análisis bi-dimensional de oligonucleótidos del virus de la fiebre aftosa: minifingerprint de ARN .....</b>	<b>35</b>
<b>Development of a more rapid and simple procedure for two-dimensional oligonucleotide analysis of foot-and-mouth disease virus: RNA minifingerprinting .....</b>	<b>39</b>
— I.E. Bergmann, B.H. Tiraboschi, M.A. Affonso Boller, V. Malirat, P.J.V. Pereira, P. Augé de Mello	
<b>Resúmenes — Abstracts .....</b>	<b>43</b>
<b>Bibliografía sobre enfermedades vesiculares — Vesicular diseases bibliography .....</b>	<b>58</b>

**CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA (HPV/OPS/OMS)**  
**Caixa Postal 589, 20001 Rio de Janeiro, RJ, Brasil**

## LA VACUNACION DE BOVINOS JOVENES CON UNA VACUNA ANTIASFOSA DE ADYUVANTE OLEOSO\*

*Paulo Augé de Mello<sup>1</sup>, Ivo Gomes<sup>1</sup>, Hans G. Bahnemann<sup>1</sup>*

### **RESUMEN**

**Bovinos jóvenes con edades entre algunos meses y un año fueron vacunados con una vacuna antiaftosa de adyuvante oleoso. Se estudió la respuesta inmunitaria con relación a la edad del animal, la presencia de anticuerpos calostrales y varios esquemas de vacunación.**

**Todos los animales nacidos de vacas vacunadas con una vacuna de adyuvante oleoso tuvieron niveles protectores de anticuerpos calostrales por lo menos durante dos meses. La primovacunación de estos terneros a los dos meses o un poco más tarde produjo una inmunidad protectora en más de la mitad de los animales. La revacunación de los animales produjo una inmunidad protectora por seis meses o más.**

**La variación del esquema de vacunación mostró que los animales revacunados entre 30 y 180 días después de la primovacunación tuvieron una respuesta inmunitaria similar y duración de protección. Por lo tanto, un ciclo de revacunación de seis meses es suficiente para proteger animales jóvenes de este grupo de edad.**

**Los programas de control de la fiebre aftosa que utilizan vacuna con adyuvante oleoso deberían incluir la vacunación de terneros de edad temprana y la revacunación entre dos y seis meses después, para entrar en el sexto mes del ciclo de vacunación de animales con menos de dos años de edad.**

### **INTRODUCCION**

En los programas nacionales o regionales de vacunación para el control de la fiebre aftosa (FA), la vacuna generalmente es aplicada en bovinos de más de cuatro meses de edad. Este esquema de vacunación es usado suponiendo que los terneros menores de cuatro meses de edad aún tienen anticuerpos calostrales, lo que interfiere en la inmunización por vacunación.

Aunque la vacunación y la protección de animales jóvenes contra la FA es una parte importante de las medidas de control, frecuentemente discutidas en reuniones, solo se encontraron algunas publicaciones en la literatura sobre este asunto. En 1960, Van Bekkum(11) informó que niveles bajos de anticuerpos calostrales pueden inhibir la respuesta inmunitaria producida por la vacunación. Mackoviak et al. (8) estudiaron la duración de la inmunidad en terneros entre 3-6 y 6-9 meses de edad. Encontraron que la inmunidad en los animales primovacunados menores de seis meses de edad era de corta duración (30 a 60 días) y recomendaron realizar por lo menos una revacunación. Muntiu et al. (9) utilizaron animales de seis meses y de 12 meses de edad. Los resultados indicaron que los animales de seis meses vacunados con una única dosis de vacuna estaban inmunizados solo por dos meses. Si hubiesen sido revacunados a los 14 días posvacunación (DPV), la inmunidad sería extendida a ocho meses.

En un estudio de vacunación con una vacuna de adyuvante oleoso, Augé de Mello et al. (1) vacunaron terneros entre 5 y 7 meses de edad y encontraron que después de una aplicación la protección contra los virus O y C llegó a nueve meses y contra el virus A hasta los 12 meses.

Durante estudios de inmunización de bovinos con vacuna antiaftosa de adyuvante oleoso, la aplicación de esta vacuna fue investigada más

\* Presentado en el: Simposio Internacional sobre Fiebre Aftosa. Ankara, Turquía, 6-8 junio 1989.

<sup>1</sup> Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (PANAFTOSA, HPV/OPS/OMS), Caixa Postal 589, 20001 Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

extensamente. El estudio fue dividido en dos partes: en la primera se investigó el efecto de los anticuerpos calostrales sobre la respuesta anamnética a la revacunación; y en la segunda parte se estudió el nivel de duración de la inmunidad en terneros después de la revacunación a diferentes intervalos después de la primovacunación.

#### MATERIALES Y METODOS

Los terneros utilizados en estos experimentos estaban en un establecimiento oficial, que no tenía historia de ocurrencia de FA por muchos años y que había cooperado con el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (PANAFTOSA) durante algunos años en la prueba de una vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso. Los animales en este establecimiento eran bovinos de carne de alta calidad. Todos los bovinos entre 4-6 meses de edad fueron vacunados regularmente con vacuna de adyuvante oleoso preparada por PANAFTOSA (1).

La vacuna antiaftosa trivalente (antígenos O, A y C) fue preparada de virus de la FA (VFA) desarrollado en cultivo de tejidos, inactivado con un inactivante de primer orden y con adyuvante que consistía de aceite mineral y un emulsificante. La vacuna fue aplicada en la dosis de 5 ml vía intramuscular (cerca de dos cm de profundidad) en el tercio superior de cuello (2).

Los terneros usados en el estudio de anticuerpos calostrales habían nacido de vacas vacunadas regularmente con una vacuna antiaftosa de adyuvante oleoso. Las muestras de suero fueron tomadas de estos animales un día después de la ingestión del calostro, antes de la vacunación, a los 105 DPV y a los siete días después de la revacunación (DPR). Los niveles de anticuerpos fueron determinados por la prueba de seroprotección en ratones lactantes (3) contra el virus vacunal homólogo de las cepas O<sub>1</sub> Campos, A Venceslau y C<sub>3</sub> Indaiáil (6).

Los estudios de duración de inmunidad después de la revacunación fueron hechos en animales seleccionados de una población de 150 terneros. Fueron seleccionados al azar 18 animales para determinar el estado inmunitario de la población. Despues, grupos de 16 animales cada uno fueron revacunados a los 30, 60, 90 y 180 días des-

pués de la primovacunación a los 4-6 meses de edad y fueron sangrados a la revacunación y a intervalos de dos meses (Fig. 1). Los títulos de neutralización de las muestras de sueros fueron determinados en pruebas de microplacas con células BHK (4).

#### RESULTADOS

En un estudio de anticuerpos calostrales en terneros, se vacunó un total de 31 animales con vacuna antiaftosa de adyuvante oleoso. La distribución por edad de esos animales a la revacunación y los niveles de anticuerpos calostrales se muestran en el Cuadro 1.

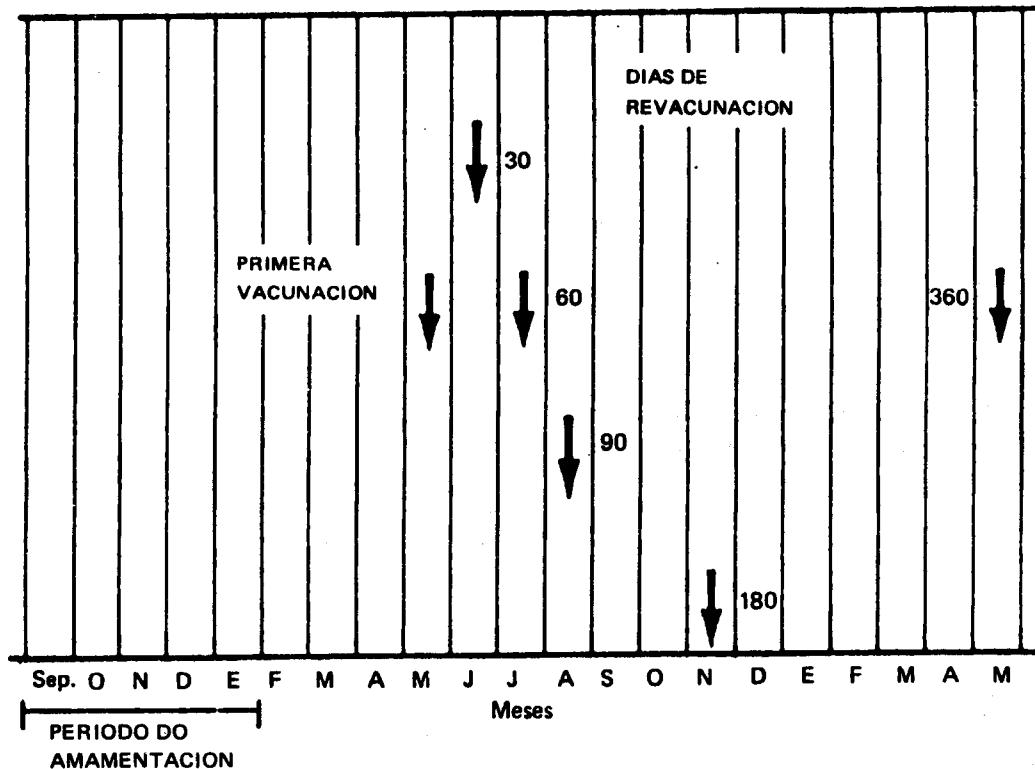
Mientras que en el grupo de animales de hasta 60 días de edad todos los animales tenían niveles de anticuerpos calostrales que indicaban protección contra la infección de los virus O y A, casi todos los animales también estaban protegidos contra el virus C. En el grupo siguiente de animales, entre 61-120 días de edad, esta protección por anticuerpos calostrales cayó por debajo del 50% y en el tercer grupo, 121-170 días, no estaban protegidos por dichos anticuerpos (ver Cuadro 1).

Los animales con niveles de anticuerpos calostrales protectores y vacunados entre los seis y 60 días de edad tuvieron muy poca protección a los 105 DPV (5). Sin embargo, a la revacunación a los 105 DPV la mayoría de los animales mostró protección contra los virus A y C. La protección contra el virus O aún era baja. Esto talvez se debió al contenido del antígeno de virus O en esta vacuna en particular.

CUADRO 1. Niveles de anticuerpos calostrales que indican protección en terneros de diferentes grupos de edad

Edad de los animales (Días)	Total	Anticuerpos calostrales <sup>a</sup>		
		Virus de la fiebre aftosa O	A	C
6-60	7	7/7	7/7	6/7
61-120	11	5/11	5/11	5/11
121-170	13	0/13	1/13	0/13

<sup>a</sup> = ISP >2,0.

**FIGURA 1. Esquema de revacunación de bovinos jóvenes**

En el grupo de animales vacunados a los 61-120 días de edad, la respuesta inmunitaria a los 105 DPV mostró que más de la mitad de los animales estaban protegidos contra los virus A y C, y que la protección contra el virus O aún permanecía baja. Despues de la revacunación de estos animales, la protección se elevó a más de 80% contra los tres tipos de virus usados en la vacuna.

El grupo de animales vacunados entre 121-170 días de edad, y que prácticamente no tenían anticuerpos calostrales, mostró una buena respuesta inmunitaria a los 105 días después de la primovacunación contra los virus A y C y una baja respuesta contra el virus tipo O. Esto mismo ocurrió en el grupo anterior. Despues de la revacunación a los 105 días, todos los animales tenían niveles de anticuerpos de protección a los 7 DPR. Los resultados se dan en el Cuadro 2.

En un estudio de duración de inmunidad despues de la revacunación, el nivel y persistencia de

anticuerpos calostrales fueron comparables a los encontrados en la primera parte del estudio (Fig. 2). El nivel y persistencia de anticuerpos séricos en animales de los diferentes grupos de revacunación fue muy similar, como se puede ver en la Fig. 3. Los animales tenían niveles de anticuerpos protectores por lo menos durante un año o más despues de la revacunación.

#### DISCUSION

Las publicaciones anteriores sobre vacunación de animales jóvenes se referían a la aplicación de vacuna de hidróxido de aluminio estándar. Con esta vacuna realmente parece difícil inmunizar terneros de más de seis meses de edad con una única vacunación (7).

**CUADRO 2. Respuesta inmunitaria en terneros con anticuerpos calostrales después de la primovacunación y revacunación con una vacuna antiaftosa de adyuvante oleoso**

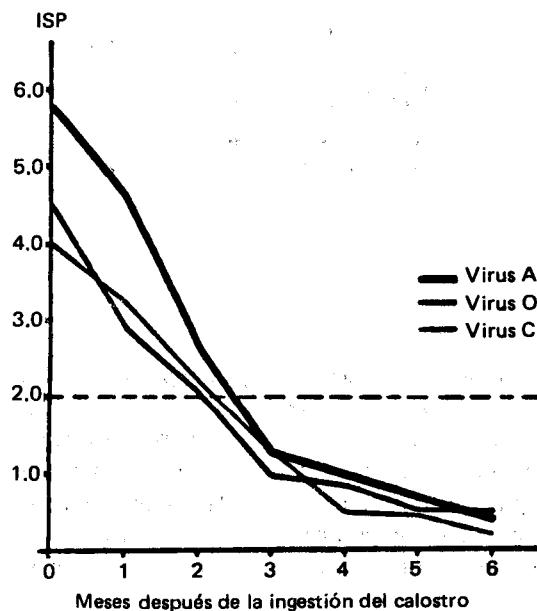
Días de edad a la vacunación	Respuesta <sup>a</sup> a la primovacunación a los 105 DPV <sup>b</sup>			Respuesta <sup>a</sup> a la revacunación a los 7 DPR <sup>c</sup>		
	O	A	C	O	A	C
6-60	1/7	2/7	2/7	2/7	6/7	6/7
61-120	3/11	6/11	6/11	8/11	9/11	10/11
121-170	3/13	9/13	9/13	13/13	13/13	13/13

*a* = ISP >2,0.

*b* = Días posvacunación.

*c* = Días posrevacunación.

**FIGURA 2. Persistencia de anticuerpos calostrales obtenidos de vacas vacunadas con una vacuna antiaftosa de adyuvante oleoso**



animales hubiesen sido revacunados a los 5-6 meses de edad (105 DPV en el experimento), la mayoría de ellos estaría protegida contra los tipos A y C del VFA. La baja protección contra el virus O debe haber sido debido a la cantidad de antígeno usado en esta vacuna en particular.

La vacunación de los terneros entre 2-4 meses de edad también resultó en la protección de más de la mitad de los animales. La revacunación a los 3,5 meses más tarde, esto es, a la edad de 6-8 meses, protegió cerca del 90% de los animales.

Los terneros primovacunados entre 4-6 meses de edad también estaban protegidos después de esta única vacunación. La revacunación a los 3,5 meses más tarde resultó en la protección de todos los animales.

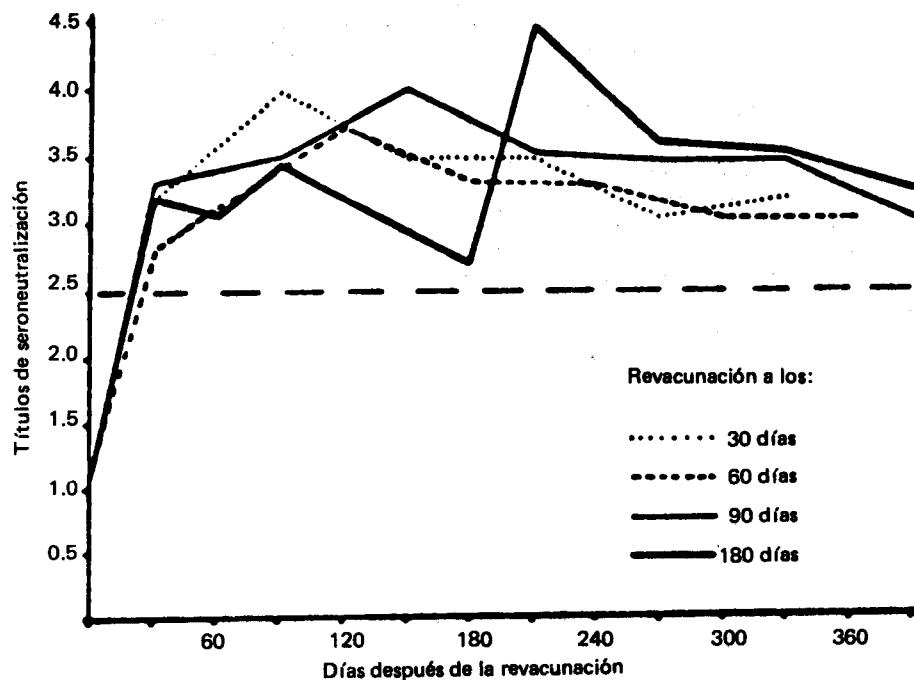
Los resultados muestran que la aplicación de una vacuna antiaftosa de adyuvante oleoso produce una mejor inmunización en los terneros a una edad temprana, cerca de dos meses. En la revacunación, la mayoría de los animales tenían anticuerpos protectores contra los tres tipos de VFA usados en la vacuna.

Después de estos resultados fue interesante estudiar el efecto del intervalo entre la primovacunación y la revacunación para una respuesta inmunitaria de mayor duración.

El esquema de revacunación fue aplicado a los 30, 60, 90 y 180 días después de la primovacunación (Fig. 1). Como indican los resultados en la Fig. 3, no hubo diferencia entre los diversos períodos de revacunación pues cada grupo de los varios esquemas tenía niveles de anticuerpos protectores por lo menos por un año o más.

Con la aplicación de vacuna con adyuvante oleoso el panorama fue diferente. Esta vacuna no inmunizó muy bien los terneros menores de dos meses de edad con una única aplicación. A esta edad la mayoría de los animales aún tenían elevados niveles de anticuerpos calostrales. Si estos

**FIGURA 3. Virus de la fiebre aftosa O<sub>1</sub>. Campos. Niveles de anticuerpos de sueros a diferentes esquemas de revacunación**



Este es un resultado interesante e importante. Significa que terneros pueden ser vacunados a los dos meses, cuando los niveles de anticuerpos castralos en muchos animales caen por debajo de los valores protectores. De esa forma los animales pueden ser revacunados entre los dos y seis meses de edad para entrar en el ciclo del sexto mes de vacunación, que es el recomendado para bovinos menores de dos años de edad. Así, el número de animales no protegidos en la población bovina puede ser reducido considerablemente, lo que da una mejor protección contra la entrada del VFA en un rebaño a través de animales susceptibles. Estos resultados son similares a los encontrados por Sadir et al. (10), los cuales muestran que en áreas endémicas donde el ganado adulto es vacunado periódicamente, la vacunación de terneros entre 30 y 60 días posparto con vacuna de adyuvante oleoso podría producir altos niveles de protección del rebaño.

#### REFERENCIAS

1. AUGÉ DE MELLO, P., ASTUDILLO, V., GOMES, I., CAMPOS GARCIA, J.T. Field application of inactivated oil adjuvanted foot-and-mouth disease virus vaccine: vaccination and revaccination of young cattle. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 19-20:39-47, 1975.
2. AUGÉ DE MELLO, P., ASTUDILLO, V., GOMES, I., CAMPOS GARCIA, J.T. Respuesta inmunitaria de bovinos adultos vacunados contra la fiebre aftosa con vacuna oleosa. Immune response of adult cattle vaccinated with oil adjuvanted foot-and-mouth disease vaccines. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 26:23-29, 1977.
3. CUNHA, R.G., BAPTISTA Jr., 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.*, 19(10):243-267, 1957.
4. FERREIRA, M.E.V. Microtiter neutralization test for the study of foot-and-mouth disease antibodies. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 21-22:21-24, 1976.

5. GOMES, I. Observations on the influence of colostral antibodies on the anamnestic response of calves re-vaccinated against foot-and-mouth disease. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 49-50: 23-26, 1984.
6. GOMES, I., ASTUDILLO, V.M. Foot-and-mouth disease: evaluation of mouse protection test results in relation to cattle immunity. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 17-18 :9-16, 1975.
7. HONIGMAN, M.N., GOMES, I., ABREU MARTINS, I. de, LOMBARDO, R.A. Persistencia en terneros de la inmunidad postvacunal contra el virus aftoso. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 2:12-20, 1971.
8. MACKOWIAK, C., FONTAINE, J., LANG, R., CAMAND, R., PETERMANN, H.G. Étude de la durée de l'immunité conférée par le vaccin anti-aphteux aux jeunes bovins. *Bull. off. Int. Épiz.*, 57(5-6):937-948, 1962.
9. MÜNTIU, N., DUMITRESCU, A., DOHOTĂRU, V., NEGRUTIU, T. Durée de l'immunité post-vaccinale contre la fièvre aphteuse par rapport à l'âge des animaux à la dose de vaccin et à la répétition de la vaccination (effet de rappel). *Bull. off. Int. Épiz.*, 77(5-6): 771-787, 1972.
10. SADIR, A.M., SCHUDEL, A.A., LAPORTE, O. Response to foot-and-mouth disease vaccines in newborn calves. Influence of age, colostral antibodies and adjuvants. *Epidem. Inf.*, 100(1):135-144, 1988.
11. Van BEKKUM, J.G. A serological analysis of the results of the Dutch foot-and-mouth disease control program. *Bull. off. Int. Épiz.*, 54:371-377, 1960.

## THE VACCINATION OF YOUNG CATTLE WITH AN OIL ADJUVANT FOOT-AND-MOUTH DISEASE VACCINE\*

Paulo Augé de Mello<sup>1</sup>, Ivo Gomes<sup>1</sup>, Hans G. Bahnenmann<sup>1</sup>

### SUMMARY

Young cattle ranging in age between a few months and one year were vaccinated with an oil adjuvant foot-and-mouth disease vaccine and their immune response studied in relation to the age of the animal, the presence of colostral antibodies and to several vaccination schedules.

All animals born from dams vaccinated with an oil adjuvant vaccine had protective colostral antibody levels for at least two months. Primovaccination of these calves at two months or a little later produced protective immunity in more than half the animals. Revaccination of these animals induced protective immunity for six months or more.

A variation of the vaccination schedule showed that animals revaccinated from 30 to 180 days after primovaccination had a similar immune response and duration of protection. A revaccination cycle of six months for young animals therefore is sufficient to provide protection for animals of this age group.

Foot-and-mouth disease control programs which apply oil adjuvant vaccine should include vaccination of calves at an early age and revaccination between two and six months later in order to enter into the six month vaccination cycle for animals under two years of age.

### INTRODUCTION

In national or regional vaccination programs for the control of foot-and-mouth disease (FMD) the vaccine is usually applied in cattle older than four months. This vaccination scheme is used under the assumption that calves less than four months old still have colostral antibodies which interfere with the immunization.

Although the vaccination and protection of young animals against FMD is an important part of the control measures and is often discussed at meetings, only a few publications can be found in the literature on this subject. In 1960 Van Bekkum reported (11) that even low levels of colostral antibodies can inhibit the immune response induced by vaccination. Mackowiak et al. (8) studied the duration of immunity in calves between 3 to 6 and 6 to 9 months. They found the immunity in primovaccinated animals less than six months old to be of a short duration (30 to 60 days) and recommended at least one revaccination. Muntiu et al. (9) used animals of 6 months and of 12 months of age. Their results indicated that animals six months old at vaccination could be immunized only for two months with a single dose of vaccine. If they were revaccinated at 14 days post vaccination (DPV) their immunity could be extended to 8 months.

In a study of the application of an oil adjuvant vaccine Augé de Mello et al. (1) vaccinated calves between 5 and 7 months and found after one vaccination protection against O and C viruses for as long as 9 months and against virus A for as long as 12 months.

During studies on the immunization of cattle with an oil adjuvant FMD vaccine the application of this vaccine in young cattle was investigated further. The study was divided into two parts. In the first part the effect of colostral antibodies

\* Presented at: International Foot-and-Mouth Disease Symposium. Ankara, Turkey, 6-8 June 1989.

<sup>1</sup> Pan American Foot-and-Mouth Disease Center (PANAFTOSA, HPV/PAHO/WHO), Caixa Postal 589, 20001 Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

on the anamnestic response upon revaccination was investigated. The second part studied the level and duration of immunity in calves after revaccination at different intervals after primovaccination.

#### MATERIALS AND METHODS

The calves used in these experiments were on a government farm, which had no record of FMD for many years and had cooperated with the Pan American Foot-and-Mouth Disease Center (PANAFTOSA) for some years in the field testing of oil adjuvant FMD vaccine. The animals on this farm were high quality crossbred beef cattle. All cattle over 4 to 6 months of age were regularly vaccinated with an oil adjuvant vaccine prepared by PANAFTOSA (1).

The oil adjuvant trivalent (O, A and C antigens) FMD vaccine was prepared from tissue culture grown FMD virus, inactivated with a first-order inactivant, and adjuvant, consisting of mineral oil and an emulsifier. The vaccine was applied in a 5 ml dose intramuscularly (about two cm deep) on the upper third of the neck (2).

The calves used in the study of colostral antibodies were born from dams vaccinated regularly with an oil adjuvant FMD vaccine. Serum samples were taken from these animals one day after ingestion of colostrum, prior to vaccination, at 105 DPV and seven days after revaccination (DPR). The antibody levels were determined by the mouse protection test in suckling mice (3) against the homologous vaccine virus strains O<sub>1</sub> Campos, A Venceslau and C<sub>3</sub> Indaiá (6).

The studies of the duration of immunity after revaccination were done in animals selected from a population of 150 calves. Serum samples from a random sample of 18 animals were taken to determine the antibody levels of the group. Later groups of 16 animals were revaccinated at 30, 60, 90 and 180 days after primovaccination at 4 to 6 months of age and were bled at revaccination and at two month intervals thereafter as given in Fig. 1. The neutralization titers of the serum samples were determined in a microplate assay with BHK cells (4).

#### RESULTS

In the study of calves with colostral antibodies a total of 31 animals were vaccinated with an oil adjuvant FMD vaccine. The age distribution of these animals at vaccination and their colostral antibody levels are given in Table 1.

While in the group of animals of up to 60 days after birth all animals had colostral antibody levels indicating protection against infection for viruses O and A, nearly all animals were also protected against virus C. In the following group of animals, between 61 and 120 days of age, this protection by colostral antibodies had fallen below 50% and the third age group, between 121 to 170 days, was no longer protected by such antibodies (see Table 1).

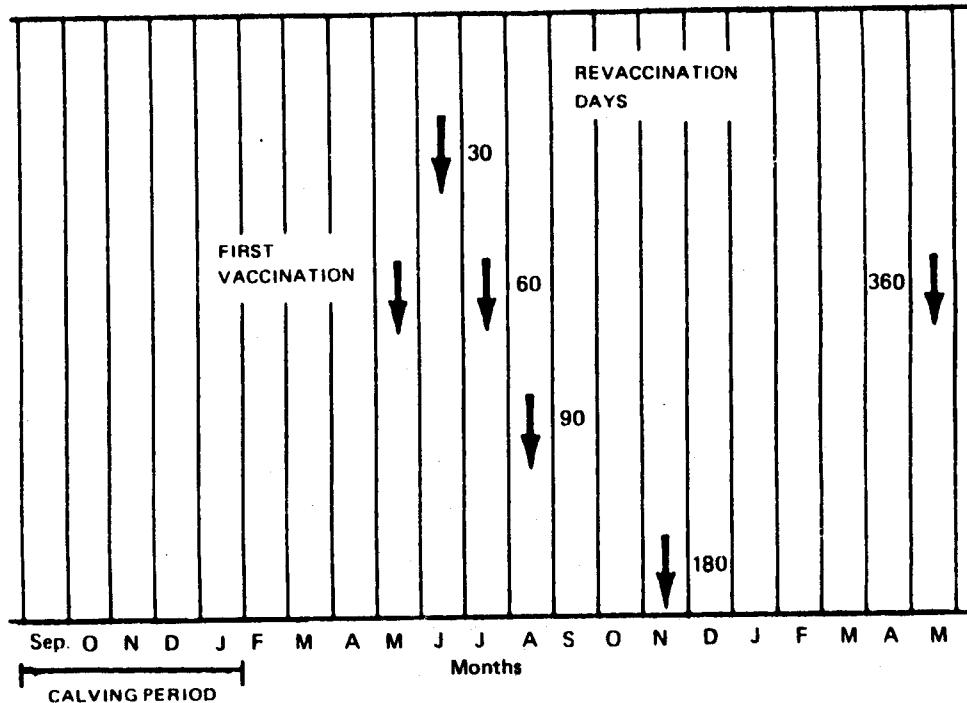
Animals vaccinated between 6-60 days of age with protective levels of colostral antibodies had very little protection at 105 DPV (5). However, upon revaccination at 105 DPV most animals were protected against viruses A and C. The protection against virus O was still low. This may have been due to the antigen content of the O virus in this particular vaccine.

In the group of animals vaccinated 61 to 120 days of age, the immune response at 105 DPV showed that more than half the animals were protected against viruses A and C; the immune response to the O virus again being lower. After revaccination of these animals the protection rose to more than 80% of these animals against the three virus types used in the vaccine.

TABLE 1. Colostral antibody levels indicating protection in calves of different age groups

Animal age (Days)	Total	Colostral antibodies <sup>a</sup> FMDV		
		O	A	C
6-60	7	7/7	7/7	6/7
61-120	11	5/11	5/11	5/11
121-170	13	0/13	1/13	0/13

<sup>a</sup> = MPI >2.0.

**FIGURE 1. Revaccination schemes of young cattle**

The group of animals vaccinated between 121 and 170 days of age and which had practically no colostral antibodies showed a good immune response at 105 days after primovaccination against A and C viruses and a low response against the O virus. This is the same picture as in the previous group. After revaccination at 105 days all of the animals had protective levels of antibodies at seven DPR. The results are given in Table 2.

In the study of duration of immunity after revaccination the level and persistence of colostral antibodies was comparable to those found in the first part of the study (Fig. 2). The level and persistence of serum antibodies in animals of the different revaccination groups were very similar, as can be seen in Fig. 3. The animals had protective levels for almost one year or more after revaccination.

## DISCUSSION

The earlier publications on vaccination of young cattle referred to the application of the standard aluminum hydroxide vaccine. With this vaccine it indeed appears to be difficult to immunize calves of less than six months with a single vaccination (7).

With the application of an oil adjuvant FMD vaccine the picture was different. This vaccine did not immunize too well calves under two months of age with a single vaccination. At this age most of the animals still had high levels of colostral antibodies. However, if these animals were revaccinated at 5 to 6 months of age (105 DPV in the experiment) almost all of them were protected against the A and C viruses. The low protection to the O virus may have been due to amount of antigen in this particular vaccine.

TABLE 2. Immune response in calves with colostral antibodies after primovaccination and revaccination with an oil adjuvant foot-and-mouth disease vaccine

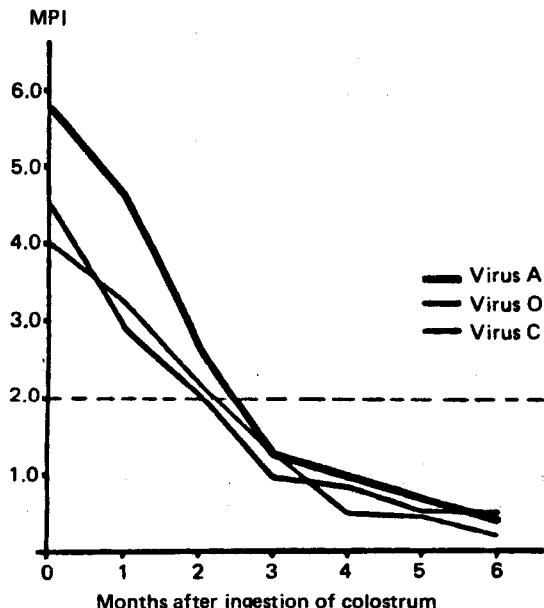
Vaccinated at days of age	Response <sup>a</sup> primovaccination at 105 DPV <sup>b</sup>			Response <sup>a</sup> revaccination at 7 DPR <sup>c</sup>		
	O	A	C	O	A	C
6-60	1/7	2/7	2/7	2/7	6/7	6/7
61-120	3/11	6/11	6/11	8/11	9/11	10/11
121-170	3/13	9/13	9/13	13/13	13/13	13/13

a = MPI >2.0.

b = Days post vaccination.

c = Days post revaccination.

FIGURE 2. Persistence of colostral antibodies obtained from dams vaccinated with an oil adjuvant foot-and-mouth disease vaccine



The vaccination of calves between 2 and 4 months already resulted in the protection of more than half of the animals. Revaccination 3.5 months later, i.e. at the age of 6 to 8 months protected about 90% of the animals.

Calves primovaccinated between 4 and 6 months were to a large extent already protected after this one vaccination. Revaccination 3.5 months later resulted in the protection of all the animals.

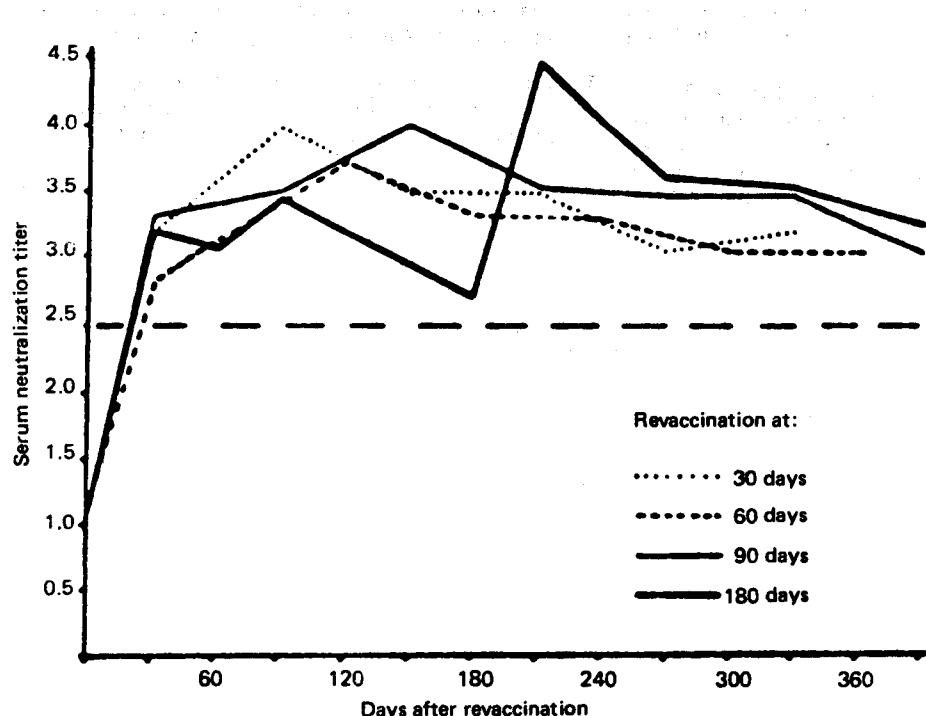
The results show that application of an oil adjuvant FMD vaccine allows a better immunization of calves at an earlier age, from about two months on. On revaccination most of the animals have protective antibody levels against the three types of FMD viruses in the vaccine.

After these results it was of interest to study the effect of the interval between primovaccination and revaccination for an immune response of longer duration.

The revaccination scheme applied was 30, 60, 90 and 180 days after primovaccination (Fig. 1). As the results in Fig. 3 indicate, there was no difference between the different revaccination periods, as each group of the different schemes had protective antibody levels for almost a year or longer.

This is an interesting and important result. It means that calves can be vaccinated at about two months, when the colostral antibody level in many animals falls below protective values. They then can be revaccinated between two and six months of age in order to enter into the six month vaccination cycle, which is recommended for cattle under two years of age. In this way the number of unprotected animals in the cattle population can be reduced considerably which gives a better protection against an entry of FMD virus into a herd through susceptible animals.

**FIGURE 3. Foot-and-mouth disease virus O<sub>1</sub>, Campos. Serum antibody levels at different revaccination schemes**



These results are similar to those found by Sadir et al. (10), which showed that in endemic areas, where the adult cattle population is vaccinated with oil adjuvant vaccine periodically, the vaccination of 30-60 days old calves could induce high protective levels in the herd.

#### REFERENCES

- AUGÉ DE MELLO, P., ASTUDILLO, V., GOMES, I., CAMPOS GARCIA, J.T. Field application of inactivated oil adjuvanted foot-and-mouth disease virus vaccine: vaccination and revaccination of young cattle. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 19-20:39-47, 1975.
- AUGÉ DE MELLO, P., ASTUDILLO, V., GOMES, I., CAMPOS GARCIA, J.T. Respuesta inmunitaria de bovinos adultos vacunados contra la fiebre aftosa con vacuna oleosa. Immune response of adult cattle vaccinated with oil adjuvanted foot-and-mouth disease vaccines. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 26:23-29, 1977.
- CUNHA, R.G., BAPTISTA Jr., 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.*, 19(10):243-267, 1957.
- FERREIRA, M.E.V. Microtiter neutralization test for the study of foot-and-mouth disease antibodies. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 21-22:21-24, 1976.
- GOMES, I. Observations on the influence of colostral antibodies on the anamnestic response of calves revaccinated against foot-and-mouth disease. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 49-50: 23-26, 1984.
- GOMES, I., ASTUDILLO, V.M. Foot-and-mouth disease: evaluation of mouse protection test results in relation to cattle immunity. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 17-18:9-16, 1975.
- HONIGMAN, M.N., GOMES, I., ABREU MARTINS, I. de, LOMBARDO, R.A. Persistencia en terneros de la inmunidad postvacunal contra el virus aftoso. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 2:12-20, 1971.

8. MACKOWIAK, C., FONTAINE, J., LANG, R., CAMAND, R., PETERMANN, H.G. Étude de la durée de l'immunité conférée par le vaccin anti-aphteux aux jeunes bovins. *Bull. off. Int. Épiz.*, 57(5-6):937-948, 1962.
9. MUNTIU, N., DUMITRESCU, A., DOHOTARU, V., NEGRUTIU, T. Durée de l'immunité post-vaccinale contre la fièvre aphteuse par rapport à l'âge des animaux à la dose de vaccin et à la répétition de la vaccination (effet de rappel). *Bull. off. Int. Épiz.*, 77(5-6): 771-787, 1972.
10. SADIR, A.M., SCHUDEL, A.A., LAPORTE, O. Response to foot-and-mouth disease vaccines in newborn calves. Influence of age, colostral antibodies and adjuvants. *Epidem. Inf.*, 100(1):135-144, 1988.
11. VAN BEKKUM, J.G. A serological analysis of the results of the Dutch foot-and-mouth disease control program. *Bull. off. Int. Épiz.*, 54:371-377, 1960.

**APLICACION DE LA TECNICA INMUNOENZIMATICA (ELISA)  
PARA EL DIAGNOSTICO DE LOS VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA Y  
ESTOMATITIS VESICULAR EN COMPARACION CON LA  
PRUEBA DE FIJACION DEL COMPLEMENTO**

*M.P.D. Gomes<sup>1</sup>, M.S. Söndahl<sup>1</sup>, M.A. Martins<sup>1</sup>,  
R. Casas Olascoaga<sup>1</sup>, A. Alonso F.<sup>1</sup>*

**RESUMEN**

Se ha comparado la técnica inmunoenzimática (ELISA) "sandwich" indirecta con la prueba de fijación del complemento 50% ( $FC_{50}$ ) para detectar los serotipos O, A y C del virus de la fiebre aftosa (VFA) y New Jersey (NJ) e Indiana (IND) del virus de la estomatitis vesicular (VEV). Para las cepas O, A, C e IND se usaron antisueros polivalentes como detectores y para las cepas NJ fueron utilizados antisueros monovalentes. La prueba de ELISA mostró ser un procedimiento más satisfactorio para identificar VFA y VEV en muestras de epitelios de animales afectados por enfermedad vesicular.

**INTRODUCCION**

El virus de la fiebre aftosa (VFA) es un Picornavirus que ocasiona una enfermedad vesicular en animales de pezuña hendida. El virus de la estomatitis vesicular (VEV) es un Rhabdovirus que también produce una enfermedad vesicular en equinos, bovinos y porcinos. El VFA tiene siete tipos serológicos distintos y de éstos los serotipos O, A y C, incluyendo varios subtipos son prevalentes en América del Sur (2). La EV es producida por los serotipos NJ e IND, que incluye los subtipos IND-1, IND-2 e IND-3 (8). Los serotipos NJ e IND son identificados

en las áreas endémicas de EV (sur de los Estados Unidos de América, México, América Central, Panamá, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela). El subtipo IND-2 es aislado esporádicamente en Argentina y Brasil y el subtipo IND-3 solo en Brasil. Ambas enfermedades son clínicamente indistinguibles en bovinos y porcinos (6).

La tipificación de los VFA y VEV en América del Sur se realiza por la prueba de fijación del complemento 50% ( $FC_{50}$ ) usando antisueros poli y monovalentes (1). La técnica inmunoenzimática (ELISA) ha probado ser más eficiente que la prueba convencional de FC para identificar VFA (9, 12) y VEV (10).

En este estudio se compara el uso de antisueros polivalentes en las pruebas de ELISA y  $FC_{50}$  para identificar los serotipos O, A y C del VFA y NJ e IND del VEV prevalentes en América del Sur.

**MATERIALES Y METODOS**

**Muestras de campo y de referencia:** Fueron reexaminadas un total de 291 muestras de epitelio de bovinos, equinos y porcinos, enviadas al Laboratorio de Referencia para las Américas/Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (PANAFTOSA) por los países de las Américas del Sur y Central entre 1952 y 1989 y conservadas a -20°C en solución buffer fosfato (PBS) con 50% de glicerina. Las muestras fueron reexaminadas por  $FC_{50}$  y analizadas por primera vez por la prueba de ELISA. Para el examen se preparó una suspensión de 20% en PBS de las muestras epiteliales.

Las suspensiones de cultivos de células BHK (11) infectadas por VFA y VEV del cepario de

<sup>1</sup> Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (PANAFTOSA, HPV/OPS/OMS), Caixa Postal 589, 20001 Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

PANAFTOSA (2, 3) que incluían: 29 del tipo O; 60 del tipo A; 21 del tipo C; 4 del tipo NJ; 4 del subtipo IND-1; 5 del subtipo IND-2 y 4 del subtipo IND-3 también fueron examinadas por las pruebas de ELISA y de FC<sub>50</sub>.

**Antisueros para las pruebas de ELISA y de FC<sub>50</sub>:** Antisueros de conejo para captura en ELISA fueron preparados por la inoculación de antígeno 146S inactivado de los VFA O<sub>1</sub> Campos-Br/58, A<sub>24</sub> Cruzeiro-Br/55 o C<sub>3</sub> Indaial-Br/71 obtenidos en células BHK. Para los antisueros de VEV, los animales fueron inmunizados con los subtipos NJ Costa Rica/66, IND-1 Costa Rica/72, IND-2 Ribeirão-Br/79 o IND-3 Agulhas Negras-Br/86 pasados en células IBRS-2 (7). Las inmunizaciones fueron realizadas de acuerdo con el método descripto (12). El suero de captura para los serotipos IND fue una mezcla de los sueros monovalentes de conejo IND-1, IND-2 e IND-3, mientras que los sueros de captura para los serotipos O, A, C y NJ fueron antisueros monovalentes de conejo.

Los anticuerpos detectores para los serotipos O, A, C e IND usados en las pruebas de ELISA y FC<sub>50</sub> fueron antisueros polivalentes producidos en cobayos con virus infeccioso adaptado a esta especie. El esquema de inmunización fue semejante al descripto previamente (4).

Para la preparación de antisueros polivalentes se usaron las siguientes cepas: para el tipo O, O<sub>1</sub> Campos-Br/58, O<sub>1</sub> Caseros-Br/67, O<sub>2</sub> Brescia-Italia/47, O<sub>3</sub> Venezuela/51, O<sub>6</sub> UK/24, O<sub>8</sub> Bahia-Br/60, O Magdalena-Col/78, O MS-Br/80 y O RS-Br/80; para el tipo A, A<sub>5</sub> Westerwald-Ger/48, A<sub>24</sub> Cruzeiro-Br/55, A<sub>32</sub> Venezuela/70, A-79 Argentina/79, A Esteller-Ven/80, A-81 Arg/81, A-84 SC-Br/84, A Col/84 y A-85 Col/85; para el tipo C, C<sub>1</sub> Noville-Smith/65, C<sub>2</sub> Pando-Uru/44, C<sub>3</sub> Resende-Br/55, C<sub>3</sub> Indaial-Br/71, C<sub>3</sub> Arg/85, C<sub>4</sub> T.del F.-Arg/66 y C<sub>5</sub> Arg/69; y para el tipo IND, IND-1 Costa Rica/72, IND-2 Ribeirão Preto-Br/79 e IND-3 Agulhas Negras-Br/86.

El anticuerpo detector para el tipo NJ fue el antisuero monovalente producido en cobayo con la cepa NJ Costa Rica/66, usando la misma metodología arriba descripta.

Todos los sueros fueron inactivados a 56°C

durante 30 minutos, fraccionados en volúmenes de 2 ml y almacenados a -20°C.

**Prueba de FC<sub>50</sub>:** Se empleó la prueba de FC<sub>50</sub> en tubo usada por PANAFTOSA para la tipificación de los VFA y VEV. Resumiendo: antisueros polivalentes O, A, C e IND de cobayo y monovalente NJ fueron usados en la dilución conteniendo 2,5 unidades fijadoras de complemento 50% contra los virus homólogos O<sub>1</sub> Campos-Br/58, A<sub>24</sub> Cruzeiro-Br/55, C<sub>3</sub> Indaial-Br/71, NJ Costa Rica/66 e IND-1 Costa Rica/72, respectivamente. Las unidades hemolíticas 50% de complemento para cada antígeno fueron determinadas previamente por titulación del complemento contra los antígenos.

Los antígenos fueron usados en la suspensión original. Se utilizaron volúmenes de 200 µl de suero, antígeno y complemento y, después de una incubación a 37°C durante 30 minutos, se adicionaron 400 µl de sistema hemolítico con una densidad óptica (DO, 545 nm) de 0,66. La mezcla fue incubada durante 30 minutos a 37°C. Después los tubos fueron centrifugados y se determinó el grado de reacción por la medición de la DO. Muestras con DO de 20% o más baja para un antisuero, en comparación con los otros antisueros y el suero control, fueron consideradas positivas para el tipo correspondiente.

**Prueba de ELISA:** Usamos la siguiente prueba de ELISA "sandwich" indirecta basada en el método descripto para diagnóstico del VFA (12):

a) A placas de ELISA se añadieron 100 µl de dilución óptima, en tampón de carbonato/bicarbonato, pH 9,6, de antisuero y suero normal de conejo y se mantuvieron en incubación a 4°C durante la noche. A continuación, las placas fueron bloqueadas con 1% de ovoalbúmina en PBS durante 1 h a 24-25°C.

b) Los antígenos fueron examinados en volúmenes de 50 µl de la suspensión original y dejados para reaccionar durante 1 h a 37°C en un vibrador.

c) Se adicionó sucesivamente los sueros de cobayo y el conjugado en volúmenes de 50 µl de la dilución óptima y se incubó a 37°C durante 30 minutos en un vibrador.

d) Se adicionó el substrato de OPD al volumen de 50 µl. La reacción se realizó durante 15 minutos a 24-25°C y fue detenida por acidificación.

e) La DO fue leída a 492 nm en un fotómetro Flow Multiskan. Los antígenos, sueros de cobayo y conjugado fueron diluidos en PBS con 0,05% de Tween-20, 1% de ovoalbúmina, 2% de suero normal de conejo, y 2% de suero normal de bovino. Las placas fueron lavadas cuatro veces entre cada paso con PBS con 0,05% de Tween-20. Las muestras con DO de 20% o más alta para un antisuero, en comparación con los otros antisueros y el suero control, fueron consideradas positivas para el tipo correspondiente.

La disposición de los reaccionantes en la placa para la tipificación del VFA y del VEV se muestra en la Figura 1.

## RESULTADOS

**Muestras de referencia:** Suspensiones de células BHK de 110 VFA y 17 VEV del cepario de PANAFTOZA fueron examinadas por ELISA y FC<sub>50</sub> para comparar la capacidad de ambos métodos de identificar las cepas más importantes del VEV y del VFA aisladas en América Central y del Sur entre 1944 y 1989. El Cuadro 1 muestra que la técnica de ELISA proporcionó resultados positivos en los 127 materiales examinados, mientras que la prueba de FC<sub>50</sub> no detectó virus en la muestra C Leticia-Col/70.

**CUADRO 1.** Resultados de tipificación obtenidos por las pruebas de ELISA y FC<sub>50</sub> en suspensión de células BHK infectadas con VFA y VEV del cepario de PANAFTOZA

Tipo de virus	Nº de cepas	Resultados positivos	
		ELISA	FC <sub>50</sub>
O	29	29	29
A	60	60	60
C	21	21	20
NJ	4	4	4
IND	13	13	13
Total	127	127	126

**FIGURA 1.** Disposición de los reaccionantes en placas para la tipificación de VFA y VEV por la prueba de ELISA "sandwich" indirecta

Suero conejo/cobayo											
O	A	C	NJ	IND	N	O	A	C	NJ	IND	N
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		TS	1				TS		5		
B											
C		TS	2				TS		6		
D											
E		TS	3			O	A	C	NJ	IND	Sin Ag
F											
G		TS	4								Sin Ag
H											

N = Suero normal.

TS= Muestra de prueba.

Ag= Antígeno.

**Muestras de campo:** Un total de 291 suspensiones de muestras de epitelio de bovinos, equinos o porcinos afectados por enfermedad vesicular fueron examinadas por ELISA o FC<sub>50</sub>. La técnica de ELISA obtuvo resultados positivos en 67,4% (196/291), mientras que por la prueba de FC<sub>50</sub> solo se tipificó virus en 54,0% (157/291) de las mismas muestras. Todas las muestras positivas por FC<sub>50</sub> también lo fueron por la técnica de ELISA.

Hubo completa concordancia entre los resultados de tipificación obtenidos por los dos métodos.

## DISCUSION

Puesto que la FA y la EV no pueden ser diferenciadas solo por los síntomas clínicos presentados por los bovinos o porcinos afectados, la identificación laboratorial del agente involucrado es esencial para el diagnóstico. El mejoramiento de las técnicas en este campo es, por lo tanto, de gran importancia para ayudar a los programas de prevención, control y erradicación de las enfermedades vesiculares.

La técnica de ELISA mostró mayor sensibilidad que la FC convencional cuando se compararon en la identificación del VFA (9, 12) y del VEV (10) usando antisueros monovalentes. Los antisueros polivalentes fueron más eficientes que los antisueros monovalentes para detectar el VFA por la prueba de FC<sub>50</sub> (4). Este aspecto fue investigado por ELISA examinando 418 muestras de referencia y de campo del VFA y del VEV. Ambas pruebas mostraron efectividad similar para identificar muestras pasadas en células BHK (Cuadro 1: muestras de referencia). Sin embargo, cuando se examinaron muestras epiteliales de campo de VFA y VEV (Cuadro 2), la técnica de ELISA proporcionó consistentemente más resultados positivos.

**CUADRO 2. Resultados de tipificación obtenidos por las pruebas de ELISA y FC<sub>50</sub> en suspensiones originales de muestras de epitelios de animales afectados por fiebre aftosa (FA) o estomatitis vesicular (EV)**

Origen	Número	Prueba	Tipo de virus					
			O	A	C	NJ	IND	Neg.
VFA	201	ELISA	37	61	17	0	0	86
VFA	201	FC <sub>50</sub>	30	42	13	0	0	116
VEV	90	ELISA	0	0	0	72	9	9
VEV	90	FC <sub>50</sub>	0	0	0	63	9	18

El elevado porcentaje de resultados positivos obtenido en suspensiones de células BHK con las dos pruebas se relacionó con la mayor concentración de antígeno en suspensiones de BHK que en muestras epiteliales, junto con el más amplio espectro de los antisueros polivalentes para identificar virus heterólogos cuando comparado con antisueros monovalentes (4).

El amplio espectro de los antisueros polivalentes como anticuerpos detectores (4) y la elevada sensibilidad de la técnica de ELISA (9, 10, 12) aumentan la posibilidad de identificar virus directamente de muestras epiteliales, principalmente de cepas diferentes que a menudo aparecen en el campo en los serotipos O, A y C del VFA (2) e IND del VEV (3, 8).

La prueba de ELISA mostró algunas reacciones cruzadas, especialmente entre los serotipos O y C del VFA (resultados no mostrados). Estas

reacciones las hemos relacionado con los epítopes comunes que las partículas 146S de las cepas del VFA poseen. Sin embargo, estas reacciones cruzadas no dieron lugar a resultados falsopositivos.

La técnica de ELISA realizada con antisueros polivalentes probablemente probará ser muy satisfactoria para apoyar los programas de preventión, control y erradicación de la FA y EV.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores son muy agradecidos a Carlos Alberto Senna y Jorge Sebastião dos Santos por su excelente asistencia técnica, y a la Srta. Carla Prete Gonçalves por la mecanografía del trabajo.

#### REFERENCIAS

1. ALONSO FERNANDEZ, A. Manual de diagnóstico de laboratorio de las enfermedades vesiculares. Rio de Janeiro, PANAFTOZA, 1986. (Ser. Man. Didáct., 15).
2. ALONSO FERNANDEZ, A., CASAS OLASCOAGA, R., ASTUDILLO, V.M., SÖNDAHL, M.S., GOMES, I., VIANNA FILHO, Y.L. Actualización de cepas del virus de la fiebre aftosa de importancia epidemiológica en América del Sur. Updating of foot-and-mouth disease virus strains of epidemiological importance in South America. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 53:3-10, 11-18, 1987.
3. ALONSO FERNANDEZ, A., SÖNDAHL, M.S. Caracterización antigenica e inmunogénica de varias cepas del serotipo Indiana de estomatitis vesicular aisladas en Brasil. Antigenic and immunogenic characterization of various strains of the Indiana serotype of vesicular stomatitis isolated in Brazil. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 51:23-26, 27-30, 1985.

- 
4. ALONSO FERNANDEZ, A., SÖNDAHL, M.S., FERREIRA, M.E.V. Preparación de un suero polivalente para el diagnóstico del virus de la fiebre aftosa por fijación del complemento. Preparation of a polyvalent antiserum for diagnosis of foot-and-mouth disease virus by complement fixation. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 47-49:3-6, 7-10, 1983.
  5. ASTUDILLO, V.M., ESTUPIÑAN, J., ROSENBERG, F., SILVA, A.J.M., DORA, J.F.P. Vesicular stomatitis in South America: description of data taken from the continental vesicular disease surveillance system. In: Proceedings of an International Conference on Vesicular Stomatitis. Mexico City, Mexico, 1984. p.23-83.
  6. COTTRAL, G.E. Diagnosis of bovine vesicular disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 161:1293-1298, 1972.
  7. De CASTRO, M.P. Behaviour of the foot-and-mouth disease virus in cell cultures: susceptibility of the IBRS-2 cell line. *Arch. Inst. Biol.*, S.Paulo, 31:63-78, 1964.
  8. FEDERER, K.E., BURROWS, R., BROOKSBY, J. B. Vesicular stomatitis virus: the relationship between some strains of the Indiana serotype. *Res. Vet. Sci.*, 8:103-117, 1967.
  9. FERRIS, N.P., DAWSON, M. Routine application of enzyme-linked immunosorbent assay in comparison with complement fixation for the diagnosis of foot-and-mouth disease and swine vesicular disease. *Vet. Microbiol.*, 16:201-209, 1988.
  10. FERRIS, M.P., DONALDSON, A.I. Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis for the vesicular stomatitis virus antigen. *Vet. Microbiol.*, 18:243-258, 1988.
  11. MCPHERSON, I.A., STOKER, M.G.P. Polymer transformation of hamster cell clons. An investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virology*, 16:147-151, 1962.
  12. ROEDER, P.L., Le BLANC SMITH, P.M. Detection and typing of foot-and-mouth disease virus by enzyme-linked immunosorbent assay: a sensitive, rapid and reliable technique for primary diagnosis. *Res. Vet. Sci.*, 43:225-232, 1987.

## APPLICATION OF ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY FOR THE DIAGNOSIS OF FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS AND VESICULAR STOMATITIS IN COMPARISON WITH THE COMPLEMENT FIXATION

M.P.D. Gomes<sup>1</sup>, M.S. Söndahl<sup>1</sup>, M.A. Martins<sup>1</sup>,  
R. Casas Olascoaga<sup>1</sup>, A. Alonso F.<sup>1</sup>

### SUMMARY

The indirect sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was compared with the 50% complement fixation ( $CF_{50}$ ) test for the detection of O, A and C serotypes of foot-and-mouth disease virus (FMDV) and New Jersey (NJ) and Indiana (IND) serotypes of vesicular stomatitis virus (VSV), using polyvalent antisera as detector for O, A, C and IND strains and monovalent antiserum for NJ strains. The ELISA proved to be a more satisfactory procedure to identify FMDV and VSV in epithelial samples from animals affected with a vesicular disease.

### INTRODUCTION

Foot-and-mouth disease (FMD) virus (FMDV) is a Picornavirus that causes a vesicular disease in cloven-hooved animals. Vesicular stomatitis (VS) virus (VSV) is a Rhabdovirus which also produces a vesicular disease in horses, cattle and swine. FMDV has seven distinct serological types and of these serotypes O, A and C, including many subtypes are prevalent in South America (2). VS is produced by the NJ and IND serotypes, which include the subtypes IND-1, IND-2 and IND-3 (8). NJ and IND-1 are found in the endemic areas of VS (southern part of the United States, Mexico, Central America, Panama,

Colombia, Ecuador, Peru and Venezuela). Subtype IND-2 is isolated sporadically in Argentina and Brazil and subtype IND-3 only in Brazil. In cattle and pigs both diseases are clinically indistinguishable (6).

The typing of FMDV and VSV in South America is performed by the 50% complement fixation ( $CF_{50}$ ) test, using polyvalent and monovalent antisera (1). The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) has proved to be more efficient than the conventional CF test to identify FMDV (9, 12) and VSV (10).

In the present study we compared the use of polyvalent antisera in the ELISA and  $CF_{50}$  test for typing the FMDV O, A and C serotypes and VSV NJ and IND serotypes which are prevalent in South America.

### MATERIALS AND METHODS

**Field and reference samples:** A total of 291 epithelial samples from cattle, horses and swine sent to the Pan American Foot-and-Mouth Disease Center/Reference Laboratory for the Americas (PANAFTOSA) by Central and South American countries from 1952 to 1989 and conserved at -20°C in phosphate buffer saline (PBS) with 50% glycerine, were re-tested by  $CF_{50}$  test and examined for the first time by ELISA. For the assay a 20% suspension in PBS of the epithelial samples was prepared.

Suspensions of BHK cell cultures (11) infected with FMDV or VSV from the strain collection of PANAFTOSA (2, 3), including: 29 type O; 60 type A; 21 type C; 4 type NJ; 4 subtype IND-1; 5 subtype IND-2; and 4 subtype IND-3 were also tested by ELISA and  $CF_{50}$ .

<sup>1</sup> Pan American Foot-and-Mouth Disease Center (PANAFTOSA, HPV/PAHO/WHO), Caixa Postal 589, 20001 Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

**Antisera for ELISA and CF<sub>50</sub> test:** Capture rabbit antisera for ELISA were prepared by the inoculation of 146S inactivated antigen of FMDV O<sub>1</sub> Campos-Br/58, A<sub>24</sub> Cruzeiro-Br/55 or C<sub>3</sub> Indaial-Br/71 propagated in BHK cells. For VSV antisera, animals were immunized with NJ Costa Rica/66, IND-1 Costa Rica/72, IND-2 Ribeirão-Br/79 or IND-3 Agulhas Negras-Br/86 grown in IBRS-2 cells (7). The immunizations were performed according to the method described (12). The capture serum for IND serotypes was a mixture of IND-1, IND-2 and IND-3 monovalent rabbit antisera, whereas the capture sera for O, A, C and NJ serotypes were the monovalent rabbit antisera.

Detection antibodies for O, A, C and IND serotypes to be used in ELISA and CF<sub>50</sub> test were polyvalent antisera which were produced in guinea pigs with infectious virus adapted to this species. The immunizing schedule was the same as the one previously described (4).

For the preparation of polyvalent antisera the following strains were used: O<sub>1</sub> Campos-Br/58, O<sub>1</sub> Caseros-Br/67, O<sub>2</sub> Brescia-Italy/47, O<sub>3</sub> Venezuela/51, O<sub>6</sub> UK/24, O<sub>8</sub> Bahia-Br/60, O Magdalena-Col/78, O MS-Br/80 and O RS-Br/80 for type O; A<sub>5</sub> Westerwald-Ger/48, A<sub>24</sub> Cruzeiro-Br/55, A<sub>32</sub> Venezuela/70, A-79 Argentina/79, A Esteller-Ven/80, A-81 Arg/81, A-84 SC-Br/84, A Col/84 and A-85 Col/85 for type A; C<sub>1</sub> Noville-Smith/65, C<sub>2</sub> Pando-Uru/44, C<sub>3</sub> Resende-Br/55, C<sub>3</sub> Indaial-Br/71, C<sub>3</sub> Arg/85, C<sub>4</sub> T.del F.-Arg/66 and C<sub>5</sub> Arg/69 for type C; and IND-1 Costa Rica/72, IND-2 Ribeirão-Br/79 and IND-3 Agulhas Negras-Br/86 for type IND.

The detector antibody for the NJ type was monovalent antiserum produced in guinea pig with the NJ Costa Rica/66 strain using the same methodology as described above.

All sera were inactivated at 56°C for 30 minutes in 2 ml volumes and stored at -20°C.

**CF<sub>50</sub> test:** The CF<sub>50</sub> tube test used by PANAFTOZA for FMDV and VSV typing was employed. Briefly: guinea pig polyvalent O, A, C and IND antisera and NJ monovalent antiserum were used in the dilution containing 2.5 fifty per cent complement fixation units against homologous O<sub>1</sub> Campos-Br/58, A<sub>24</sub> Cruzeiro-Br/55,

C<sub>3</sub> Indaial-Br/71, NJ Costa Rica/66 and IND-1 Costa Rica/72 viruses, respectively. The fifty per cent complement hemolytic units for each antigen were determined previously by titrating the complement against the antigens.

The antigens were used in their original suspension. Serum, antigen and complement were used in 200 µl volumes and after incubation at 37°C for 30 min., 400 µl of hemolytic system with an optical density (OD, 545 nm) of 0.66 was added. The mixture was allowed to react for 30 min. at 37°C. Afterwards, the tubes were centrifuged and the degree of the reactions was determined by OD measurement. Samples with OD of 20% or lower for one antiserum, in comparison with the other antisera and control serum, were considered positive for the corresponding type.

**ELISA procedure:** We used the indirect sandwich ELISA based on the method described for FMDV diagnosis (12) as follows:

(a) ELISA plates were coated overnight at 4°C with 100 µl of the optimal dilution, in carbonate/bicarbonate buffer, pH 9.6, of rabbit antisera and normal rabbit serum. The plates were subsequently blocked for 1 h at 24-25°C with 1% ovoalbumine in PBS.

(b) The antigens were tested in 50 µl volumes of the original suspension and left to react for 1 h at 37°C on a plate shaker.

(c) Guinea pig sera and conjugate were added successively in 50 µl volumes of the optimal dilution and incubated at 37°C for 30 min. on a plate shaker.

(d) OPD substrate was added at 50 µl volume. The reaction was allowed to proceed for 15 min. at 24-25°C and stopped by acidification.

(e) ODs were read with a Flow Multiskan photometer at 492 nm. Antigens, guinea pig sera and conjugate were diluted in PBS containing 0.05% Tween 20, 1% ovoalbumine, 2% normal rabbit serum and 2% normal bovine serum. The plates were washed four times between each step with PBS containing 0.05% Tween 20. Samples with OD of 20% or greater for one antiserum, in comparison with the other antisera and control serum, were considered positive for the corresponding type.

The arrangement of the reagents on the plate for FMDV and VSV typing is shown in Figure 1.

## RESULTS

**Reference samples:** BHK cells suspensions of 110 FMDV and 17 VSV from PANAFTOSA strain collection were examined by ELISA and CF<sub>50</sub> test to compare the ability to identify the most important VSV and FMDV strains isolated in Central and South America from 1944 to 1989 by both tests. Table 1 shows that the ELISA gave positive results in all 127 samples examined, while de CF<sub>50</sub> test did not detect virus in the virus C Leticia-Col/70.

**Field samples:** A total of 291 suspensions of epithelial samples from cattle, horses or swine affected with a vesicular disease were examined by ELISA and CF<sub>50</sub> test. The ELISA gave positive results in 67.4% (196/291), whereas the CF<sub>50</sub> test only typed virus in 54.0% (157/291) of the same samples. All specimens positive by CF<sub>50</sub> test were also positive by ELISA.

There was complete agreement between the typing results obtained by both tests.

## DISCUSSION

Since FMD and VS in cattle or swine cannot be distinguished on clinical signs alone, laboratory identification of the agent involved is essential for diagnosis. The improvement of diagnostic

**FIGURE 1. Arrangement of reagents on plate for FMDV and VSV typing by the indirect sandwich ELISA**

Rabbit/guinea pig serum											
O	A	C	NJ	IND	N	O	A	C	NJ	IND	N
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		TS	1				TS		5		
B											
C		TS	2				TS		6		
D											
E		TS	3			O	A	C	NJ	IND	No Ag
F											
G		TS	4								No Antigen
H											

N = Normal serum.

TS = Test sample.

Ag = Antigen.

techniques thus is of great importance in order to help the prevention, control and eradication programs of vesicular diseases.

The higher sensitivity of the ELISA was clear when compared with the conventional CF test to identify FMDV (9, 12) and VSV (10) using monovalent antisera. Polyvalent antisera were more efficient than the monovalent antisera to detect FMDV by CF<sub>50</sub> test (4). This aspect was investigated by ELISA testing of 418 reference and field samples of FMDV and VSV. Both tests showed similar effectiveness to identify samples passed in BHK cells (Table 1: reference samples). However, when epithelial samples from the field were examined (Table 2) the ELISA provided consistently more positive results with both FMDV and VSV samples.

The high percentage of positive results obtained on BHK suspensions by both tests relates to the greater antigen concentration in BHK suspensions than in epithelial samples, together with the broader spectrum of polyvalent antisera to identify heterologous virus when compared with monovalent antisera (4).

**TABLE 1. Results of typing achieved by ELISA and CF<sub>50</sub> test on suspension of BHK cells infected with FMD and VSV of the PANAFTOSA strain collection**

Virus type	Number of strains	Positive results	
		ELISA	CF <sub>50</sub>
O	29	29	29
A	60	60	60
C	21	21	20
NJ	4	4	4
IND	13	13	13
Total	127	127	126

TABLE 2. Results of typing achieved by ELISA and CF<sub>50</sub> test on original suspensions of epithelial samples from animals affected by foot-and-mouth disease (FMD) or vesicular stomatitis (VS)

Samples			Virus type					
Origin	Number	Test	O	A	C	NJ	IND	Neg.
FMDV	201	ELISA	37	61	17	0	0	86
FMDV	201	CF <sub>50</sub>	30	42	13	0	0	116
VSV	90	ELISA	0	0	0	72	9	9
VSV	90	CF <sub>50</sub>	0	0	0	63	9	18

The broad spectrum of the polyvalent antisera as antibody detector (4) along with the high sensitivity of the ELISA (9, 10, 12) increases the possibility of identifying, directly from epithelial samples, markedly different strains that sporadically appear in the field in the O, A and C FMDV serotypes (2) and VSV IND serotype (3, 8).

The ELISA results show some cross-reactions, specially between O and C FMDV serotypes (results not shown) which we related to the common epitopes of the 146 particles of FMDV strains. However, these cross reactions did not produce false-positive results.

The ELISA technique performed with polyvalent antisera will probably prove to be a more satisfactory test in support of the prevention, control and eradication programs for the FMD and VS.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are extremely grateful to Carlos Alberto Senna and Jorge Sebastião dos Santos for their excellent technical assistance. We also wish to thank Miss Carla Prete Gonçalves for typing the paper.

#### REFERENCES

1. ALONSO FERNANDEZ, A. Manual de diagnóstico de laboratorio de las enfermedades vesiculares. Rio de Janeiro, PANAFTOZA, 1986. (Ser. Man. Didáct., 15).
2. ALONSO FERNANDEZ, A., CASAS OLASCOAGA, R., ASTUDILLO, V.M., SÖNDAHL, M.S., GOMES, I., VIANNA FILHO, Y.I.. Actualización de cepas del virus de la fiebre aftosa de importancia epidemiológica en América del Sur. Updating of foot-and-mouth disease virus strains of epidemiological importance in South America. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 53:3-10, 11-18, 1987.
3. ALONSO FERNANDEZ, A., SÖNDAHL, M.S. Caracterización antigenica e inmunogénica de varias cepas del serotipo Indiana de estomatitis vesicular aisladas en Brasil. Antigenic and immunogenic characterization of various strains of the Indiana serotype of vesicular stomatitis isolated in Brazil. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 51:23-26, 27-30, 1985.
4. ALONSO FERNANDEZ, A., SÖNDAHL, M.S., FERREIRA, M.E.V. Preparación de un suero polivalente para el diagnóstico del virus de la fiebre aftosa por fijación del complemento. Preparation of a polyvalent antiserum for diagnosis of foot-and-mouth disease virus by complement fixation. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 47-49:3-6, 7-10, 1983.
5. ASTUDILLO, V.M., ESTUPIÑAN, J., ROSENBERG, F., SILVA, A.J.M., DORA, J.F.P. Vesicular stomatitis in South America: description of data taken from the continental vesicular disease surveillance system. In: Proceedings of an International Conference on Vesicular Stomatitis. Mexico City, Mexico, 1984. p.23-83.
6. COTTRAL, G.E. Diagnosis of bovine vesicular disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 161:1293-1298, 1972.
7. DE CASTRO, M.P. Behaviour of the foot-and-mouth disease virus in cell cultures: susceptibility of the IBRS-2 cell line. *Arch. Inst. Biol.*, S.Paulo, 31:63-78, 1964.

- 
8. FEDERER, K.E., BURROWS, R., BROOKSBY, J. B. Vesicular stomatitis virus: the relationship between some strains of the Indiana serotype. *Res. Vet. Sci.*, 8:103-117, 1967.
  9. FERRIS, N.P., DAWSON, M. Routine application of enzyme-linked immunosorbent assay in comparison with complement fixation for the diagnosis of foot-and-mouth disease and swine vesicular disease. *Vet. Microbiol.*, 16:201-209, 1988.
  10. FERRIS, M.P., DONALDSON, A.I. Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis for the vesicular stomatitis virus antigen. *Vet. Microbiol.*, 18:243-258, 1988.
  11. MCPHERSON, I.A., STOKER, M.G.P. Polymer transformation of hamster cell clons. An investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virology*, 16:147-151, 1962.
  12. ROEDER, P.L., Le BLANC SMITH, P.M. Detection and typing of foot-and-mouth disease virus by enzyme-linked immunosorbent assay: a sensitive, rapid and reliable technique for primary diagnosis. *Res. Vet. Sci.*, 43:225-232, 1987.

## IDENTIFICACION DE ANTICUERPOS DE LA LENGUA AZUL POR LA TECNICA DE INMUNODIFUSION EN GEL DE AGAR

*Rossana Allende S.<sup>1</sup>, Gonçala M. Arita<sup>2</sup>, Magnus S. Söndahl<sup>1</sup>, Albino Alonso F.<sup>1</sup>*

### **RESUMEN**

Se preparó un antígeno soluble del virus de la lengua azul (VLA) para ser utilizado en pruebas de inmunodifusión en gel de agar (IDGA). Dicho antígeno es grupo específico, y es capaz de detectar anticuerpos inducidos por cualquiera de los 24 serotipos del VLA. Fue producido a partir del VLA serotipo 4 y controlado en IDGA frente a antígenos y sueros de referencia (NVSL, Ames, EUA; LARA, Campinas, Brasil; Veterinary Diagnostic Technology, Inc., EUA) y por la técnica inmunoenzimática (ELISA) con anticuerpo monoclonal 3-17-A3 (IADR, Pirbright, Inglaterra). Todas las pruebas mostraron una reacción de total identidad con los reactivos controles.

### **INTRODUCCION**

La lengua azul (LA) es una enfermedad viral de los rumiantes, transmitida por artrópodos y caracterizada por congestión, edema y hemorragia. El agente etiológico pertenece a la familia *Reoviridae*, género Orbivirus, del cual se reconocen 24 serotipos.

La enfermedad está ampliamente distribuida en el mundo. Afecta principalmente a los ovinos, donde se observa la siguiente sintomatología clínica: inflamación de mucosas digestiva y respiratoria anteriores que proporciona una tonalidad azulada a las mismas. En casos graves puede

evolucionar a ulceraciones, y puede observarse inflamación en las patas y deformaciones fetales. La mortalidad es baja. En las otras especies de rumiantes, generalmente no se observan síntomas clínicos, y pueden actuar como reservorios del virus por largos períodos (2).

### **DIAGNOSTICO**

El aislamiento del virus de la lengua azul (VLA) se hace por inoculación intravenosa de embriones de pollo de 8-12 días de edad con muestras de sangre recolectadas de animales en etapa de viremia.

El diagnóstico serológico (identificación de anticuerpos en el suero) se hace por fijación del complemento (FC), inmunodifusión en gel de agar (IDGA), seroneutralización en células (SN) y recientemente también por la técnica inmunoenzimática (ELISA). Las pruebas de FC, IDGA y ELISA revelan la presencia de anticuerpos grupo específicos de LA.

Actualmente el movimiento de exportación-importación de animales entre diferentes áreas se realiza con el estudio previo de los sueros para detectar la presencia de anticuerpos anti-VLA. Para tal fin, una de las pruebas utilizadas es la IDGA.

La prueba de IDGA detecta anticuerpos en el suero a partir de 10 días postinfección. Los anticuerpos detectados son grupo específicos, es decir, han sido inducidos por cualquiera de los 24 serotipos del VLA. Pueden observarse reacciones cruzadas con sueros de animales que han padecido la enfermedad hemorrágica epizoótica del ciervo.

### **MATERIALES Y METODOS**

**Antígeno (Ag):** Botellas rolantes con células BHK<sub>21</sub>, Clon 13 mantenidas en estufa a 37°C fueron inoculadas con VLA serotipo 4 (1) y nuevamente colocadas en estufa a 37°C. Trans-

<sup>1</sup> Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (PANAFTOSA, HPV/OPS/OMS), Caixa Postal 589, 20001 Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

<sup>2</sup> Laboratório Regional de Apoio Animal (LARA), Caixa Postal 5538, 12100 Campinas, SP, Brasil.

curridas 72 horas se observó efecto citopático, y fueron tratadas con 3% de cloroformo, congeladas, descongeladas y clarificadas por centrifugación a 10.000g durante 30 minutos. Seguidamente fueron inactivadas con 5 mM de etilenimina binaria a 26°C durante 24 horas.

A continuación la suspensión de virus inactivada fue concentrada con filtro Amicon de 100.000 NMWL, seguido de una ultracentrifugación durante 2 horas a 200.000 g. Al sobrenadante, que constituye el Ag, se le agrega 0,02% de NaN<sub>3</sub> y se conserva a 4°C en fracciones de 2 ml.

Previo a la titulación, se realizan los controles de especificidad de grupo y se estudia el Ag producido frente a Ags y sueros de referencia. El Ag fue controlado por IDGA con reactivos de referencia de NVSL, Ames, EUA, LARA, Campinas, Brasil, y Veterinary Diagnostic Technology, Inc., EUA; y en ELISA frente al anticuerpo monoclonal específico 3-17-A3, según protocolo de IADR, Pirbright, Inglaterra. Una vez confirmada la especificidad de grupo se procede a la titulación del Ag.

**Suero control positivo (SCP):** El SCP es una mezcla de sueros de bovinos del estado de Rio de Janeiro, Brasil, positivos a LA por IDGA, los cuales fueron concentrados cuatro veces por precipitación de las inmunoglobulinas con sulfato de amonio. Después se agregó 0,02% de NaN<sub>3</sub>, conservándose a -20°C en fracciones de 2 ml.

**Agar al 2%:** Se disuelven 20 gramos de agar purificado (Difco) en 1100 ml de agua destilada desmineralizada y se esteriliza a 15 libras de presión durante 15 minutos. Seguidamente se vierte en una bandeja, se deja solidificar, se corta en cubos de aproximadamente 2 cm de lado, se sumergen en agua destilada y se conservan a 4°C, hasta su uso.

**Tampón borato (TB):** Se prepara 0,05 M de hidróxido de sodio (NaOH), 0,15 M de ácido bórico (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>), 1% de NaN<sub>3</sub>, pH 8,6.

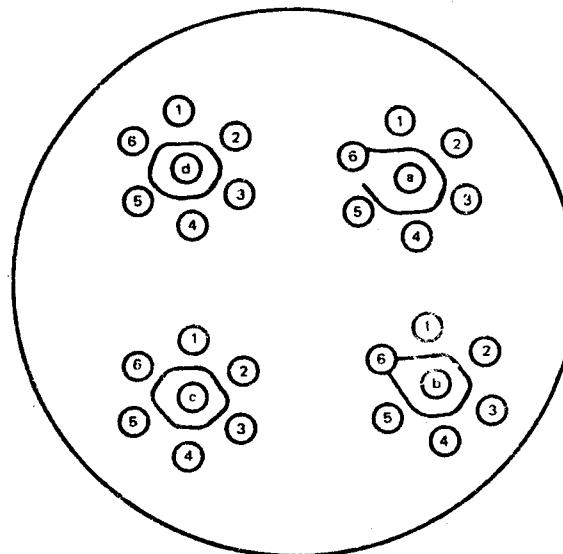
**Preparación de placas con agar al 1%:** El agar al 2% es mezclado en partes iguales con TB y fundido por calentamiento en baño María. A continuación se vierten 16 ml de la mezcla agar-TB en placas de Petri descartables de plástico o de vidrio de 90 mm de diámetro, las cuales se mantienen semidestapadas a temperatura ambiente (25 a 30°C) durante un mínimo de dos horas, para garantizar una adecuada gelificación del agar. Las placas que

no son usadas inmediatamente pueden conservarse en heladera a 4°C durante una semana.

Las cavidades en el agar son hechas con un molde que tiene siete perforadores dispuestos uno en el centro y seis en la periferia, de 4 mm de diámetro externo cada uno, equidistantes 2 mm entre sí y del central. En cada placa pueden hacerse siete moldes. El agar de las cavidades se extrae por succión con bomba de vacío inmediatamente antes de colocar los reactivos en la placa.

**Titulación del Ag y del SCP:** Cada partida de Ag y de SCP es titulada para determinar la dilución óptima de uso. El Ag y SCP son diluidos en base 2 (1:1 a 1:8) en TB, y cada dilución de Ag se coloca en las cavidades centrales de cada molde y las diluciones de SCP son depositadas en cuatro cavidades de la periferia. En las dos cavidades restantes de la periferia se coloca un SCP de referencia (Fig. 1). Al depositar los reactivos ha de tenerse la precaución de llenar las cavidades hasta el borde.

**FIGURA 1. Titulación de antígeno (Ag) y suero control positivo (SCP) para lengua azul**



- a, b, c y d = Diluciones de Ag 1:1, 1:2, 1:4 y 1:8, respectivamente.
- 1 y 4 = Suero positivo de referencia.
- 2, 3, 5 y 6 = Diluciones de SCP 1:1, 1:2, 1:4 y 1:8 respectivamente.

Una buena distribución de los mismos se consigue con micropipetas graduadas o con pipetas Pasteur.

Las placas se incuban por 48 horas a temperatura ambiente en una superficie nivelada. Posteriormente se realiza la lectura y se elige las diluciones óptimas de uso que son aquellas que, analizadas conjuntamente, proporcionan la reacción más nítida.

**Especificidad y sensibilidad de Ag y SCP:** Despues de determinar la dilución de uso de cada lote de Ag y SCP, ambos son analizados comparativamente con Ag y SCP padrones, frente a una serie de sueros positivos y negativos de varias especies, con diferente intensidad de reacción, para determinar su especificidad y sensibilidad.

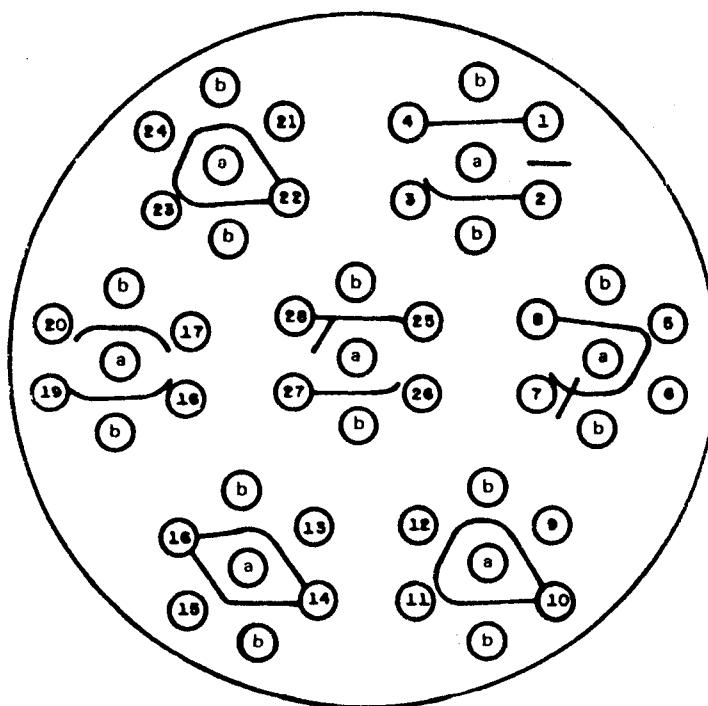
**Análisis de sueros:** Los sueros a ser examinados, después de registrados y numerados convenientemente, son colocados en las placas debidamente identificadas. La distribución de los sueros

se hace en el sentido de las agujas del reloj en los moldes y en la placa. En cada molde se colocan cuatro sueros sin diluir en cuatro cavidades de la periferia. En las dos restantes se añade el SCP. El Ag es depositado en la cavidad central conforme el esquema indicado en la Fig. 2. Seguidamente, las placas son incubadas a temperatura ambiente en una mesa nivelada.

**Lectura de las placas:** Las placas se colocan sobre una frente de luz indirecta, con fondo oscuro y la lectura se hace entre 24 y 48 horas después de haber adicionado los reactivos en las placas. En este tiempo las líneas de precipitación son nítidas. Lecturas realizadas después de las 48 horas son difíciles de interpretar, debido a que las líneas se tornan difusas.

A veces, cuando se trabaja con sueros muy hemolizados o que tienen altas concentraciones de lípidos u otras substancias, aparecen líneas de difusión no específicas, las cuales dificultan la lectu-

**FIGURA 2. Distribución de sueros a ser analizados, Ag y SCP en una placa de Petri y reacción de los mismos**



a y b = Ag y SCP respectivamente.  
1 a 28 = Sueros en estudio.

**CUADRO 1. Interpretación de las reacciones proporcionadas por los sueros analizados en la Fig. 2.**

Nº suero	Result.	Nº suero	Result.
1	-	15	++
2	-	16	-
3	+	17	+
4	-	18	+
5	+	19	?
6	++	20	+
7	+	21	++
8	-	22	-
9	++	23	+
10	-	24	++
11	+	25	?
12	++	26	+
13	++	27	-
14	-	28	-

- negativo, + positivo,  
++ positivo intenso, ? dudoso.

ra. Este inconveniente puede subsanarse lavando el agar con solución fisiológica 10x antes de hacer la lectura.

## RESULTADOS

Todos los sueros a ser examinados están continuos al SCP, lo que permite observar si las líneas de precipitación originadas mantienen la identidad con la del SCP. Ha de tenerse presente que algunos sueros dan líneas o reacciones de no identidad o inespecíficas para el Ag de la LA, siendo aquellas que cruzan o tocan la línea de precipitación específica originada por el Ag y SCP de la LA (ver Fig. 2 y Cuadro 1):

a) **Suero negativo (-):** Son aquellos en la línea de referencia, es decir, la originada por el Ag y el SCP, entra en la cavidad del suero en estudio.

b) **Suero positivo (+):** La línea de referencia presenta una pequeña curvatura próxima al suero en estudio.

c) **Suero positivo intenso (++):** La situación y apariencia de la línea de precipitación originada por el suero en estudio son similares en intensidad a la del SCP.

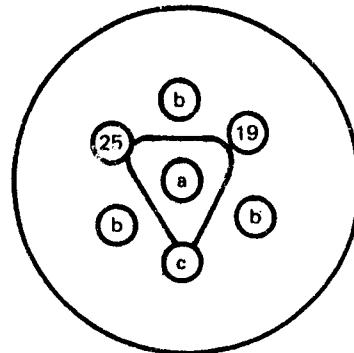
d) **Suero dudoso (?):** Los sueros que por cualquier motivo no pueden encuadrarse como -, + o ++ son reexaminados usando el siguiente procedimiento:

**Repetición de los sueros dudosos.** Los sueros son analizados nuevamente por IDGA, colocando el SCP en tres cavidades alternadas de la periferia, en dos restantes los sueros dudosos y en la tercera un suero negativo. De esta manera se observa la reacción en las dos líneas de referencia contiguas y en comparación con el suero negativo (ver Fig. 3).

La interpretación se hace de la manera indicada en el apartado anterior.

Con los sueros que nuevamente no permiten ser catalogados en la categoría + o - es aconsejable repetir la prueba con una nueva muestra de suero.

**FIGURA 3. Análisis de sueros que proporcionaron resultados dudosos en la prueba mostrada en la Fig. 2 (sueros N° 19 y 25)**



a y b = Ag y SCP respectivamente.

c = Suero control negativo.

19 y 25 = Sueros en estudio (19+ y 25?).

Pedir nueva muestra suero N° 25.

## REFERENCIAS

1. GROOCOCK, C.M., CAMPELL, C.H. Isolation of an exotic serotype of bluetongue virus from imported cattle in quarantine. *Can. S. Comp. Med.*, 46:160-164, 1982.
2. OBDEYN, I.M. Bluetongue. A review of the disease. Rio de Janeiro, Pan American Foot-and-Mouth Disease Center, 1987. (*Scien. Tech. Monog.*, 16).

## IDENTIFICATION OF BLUETONGUE ANTIBODIES BY THE TECHNIQUE OF IMMUNODIFUSION IN AGAR GEL

*Rossana Allende S.<sup>1</sup>, Gonçala M. Arita<sup>2</sup>, Magnus S. Söndahl<sup>1</sup>, Albino Alonso F.<sup>1</sup>*

### **SUMMARY**

A soluble antigen of the bluetongue virus (BTV) was prepared for use in immunodiffusion in agar gel tests (IDAG). The antigen is group specific and is capable of detecting antibodies induced by any of the 24 BTV serotypes. It was produced from type 4 BTV serotype and controlled in IDAG against reference antigens and sera (NVSL, Ames, USA; LARA, Campinas, Brazil; Veterinary Diagnostic Technology, Inc., USA) and by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with 3-17-A3 monoclonal antibody (IADR, Pirbright, England). All tests yielded a reaction of total identity with the control reagents.

### **INTRODUCTION**

Bluetongue (BT) is a viral disease in ruminants. It is transmitted by arthropods and is characterized by congestion, edema and hemorrhage. The etiological agent belongs to the *Reoviridae* family, Orbivirus genre, which includes 24 serotypes.

The disease is widely distributed throughout the world, and affects mainly sheep, in which the following clinical symptomatology is observed: inflammation of anterior digestive and respiratory mucosas which causes a bluish color. Serious cases may evolve into ulcerations. Inflammation of the feet and fetal deformation may

occur. Mortality is low. Clinical symptoms are generally not observed in other species of ruminants, but they may act as virus reservoirs for long periods of time (2).

### **DIAGNOSIS**

The bluetongue virus (BTV) is isolated by intravenous inoculation of 8-12 day-old chicken embryos with blood samples collected from animals in the viremia stage.

The serological diagnosis (identification of antibodies in the serum) is done by complement fixation (CF), immunodiffusion in agar gel (IDAG), seroneutralization in cells (SN) and, recently, also by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) technique. The CF, IDAG and ELISA tests reveal the presence of BT group-specific antibodies.

For the import/export movement of animals, serum is previously tested for the presence of anti-BTV antibodies. The IDAG is one of the tests used for this purpose.

The IDAG detects antibodies in the serum beginning from 10 days post-infection. The detected antibodies are group specific, i.e., they have been induced by any of the 24 BTV serotypes. Cross reactions can be observed with sera from animals that have had epizootic hemorrhagic disease of deer.

### **MATERIALS AND METHODS**

<sup>1</sup> Pan American Foot-and-Mouth Disease Center (PANAFTOSA, HPV/PAHO/WHO), Caixa Postal 589, 20001 Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

<sup>2</sup> Laboratório Regional de Apoio Animal (LARA), Caixa Postal 5538, 12100 Campinas, SP, Brazil.

**Antigen (Ag):** Roller bottles containing BHK<sub>21</sub> clon 13 cells grown at 37°C were inoculated with BTV serotype 4 (1) and returned to the incubator at 37°C. Cytopathic effect was observed 72 hours later and the bottles were treated with 3% chloroform, then frozen, thawed and

clarified by centrifugation at 10,000g for 30 minutes. They were immediately inactivated with 5mM of binary ethylenimine at 26°C for 24 hours.

The inactivated virus suspension was concentrated with 100,000 NMWL Amicon filter, followed by 2 hours of ultracentrifugation at 200,000g. Later, 0.02% NaN<sub>3</sub> was added. The suspension was titrated in IDAG and stored as 2 ml volumes at 4°C until used.

Before titration, specificity controls are performed and the Ag produced is studied against Ags and reference sera. The Ag is controlled by IDAG with reference reagents from NVSL, Ames, USA, LARA, Campinas, Brazil, and the Veterinary Diagnostic Technology Inc., USA; and by ELISA against the specific monoclonal antibody 3-17-A3, according to protocol of IADR, Pirbright, England. The Ag is titrated when specificity of the group is confirmed.

**Positive Control Serum (PCS):** The PCS is a mixture of sera taken from cattle in the state of Rio de Janeiro, Brazil, which was positive to the IDAG test for BT. The sera were concentrated four times by precipitation of the immuno globulins with ammonium sulfate. Then 0.02% of NaN<sub>3</sub> was added, and the sera were stored as 2 ml volumes at -20°C.

**2% Agar:** 20 grams of purified agar (Difco) are dissolved in 1100 ml of demineralized distilled water and sterilized for 15 minutes at 15 pounds pressure. The solution is then poured into a tray, left to solidify, and cut into cubes with sides measuring approximately 2 cm. The cubes are immersed in distilled water and stored at 4°C until utilized.

**Borate Buffer (BB):** A buffer is prepared with 0.05 M of sodium hydroxide (NaOH), 0.15 M boric acid (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>), 1% of NaN<sub>3</sub>, pH 8.6.

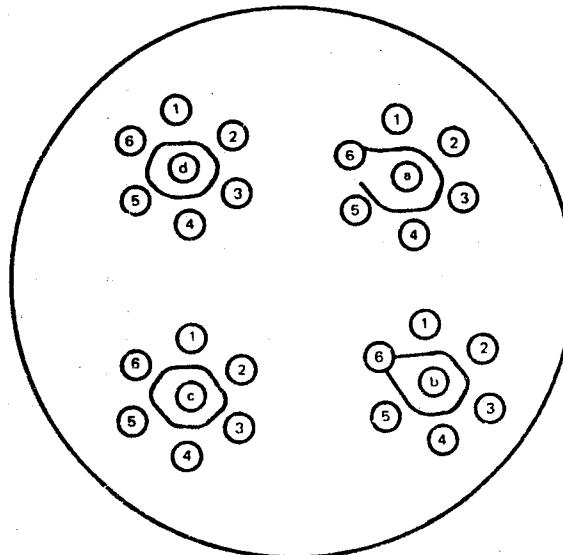
**Preparation of 1% Agar Plates:** The 2% agar is mixed with equal parts of BB and blended by heat in a water bath at boiling temperature. 16 ml of the BB-agar mixture are then poured into disposable plastic or glass Petri plates with a diameter of 90 mm. The plates are kept partially covered at room temperature (25-30°C) for a minimum of two hours to ensure acceptable

agar gelling. Plates not used immediately may be stored in a cooler at 4°C for one week.

The wells in the agar gel are formed with a mold so as to make seven wells, one in the center and six forming a ring around it. All wells have an external diameter of 4 mm, and are equidistant 2mm for each other and from the center well. The agar can be removed from the well holes by suction using a vacuum pump, right before placing the reagents on the plate.

**Titration of the Ag and the PCS:** Each batch of Ag and PCS is titrated to determine the optimal dilution to be used. The Ag and PCS are diluted twofold (1:1 to 1:8) in BB and each dilution of Ag is placed in the central well of each mold. The PCS dilutions are placed in four of the surrounding ring wells. A reference PCS is put into the two remaining wells (Fig. 1). Care must be taken to put in enough reagent to fill the wells

FIGURE 1. Titration of antigen (Ag) and positive control serum (PCS) for bluetongue



a, b, c, and d = Dilutions of Ag 1:1, 1:2, 1:4 and 1:8, respectively.

1 and 4 = Positive reference serum.

2, 3, 5 and 6 = Dilutions of PCS 1:1, 1:2, 1:4 and 1:8, respectively.

completely. Graduated micropipettes or Pasteur pipettes can be used to ensure good distribution of the reagents.

The plates are incubated for 48 hours at room temperature on a level surface. The reading is then made and the optimal dilutions are those which, when analyzed jointly, yielded sharpest line.

**Specificity and Sensitivity of Ag and PCS:** After determination of the optimal dilution of each batch of Ag and PCS, both are compared to standard Ag and PCS, to determine their specificity and sensitivity. This comparison utilizes a series of positive and negative sera from several species having different intensity of reaction.

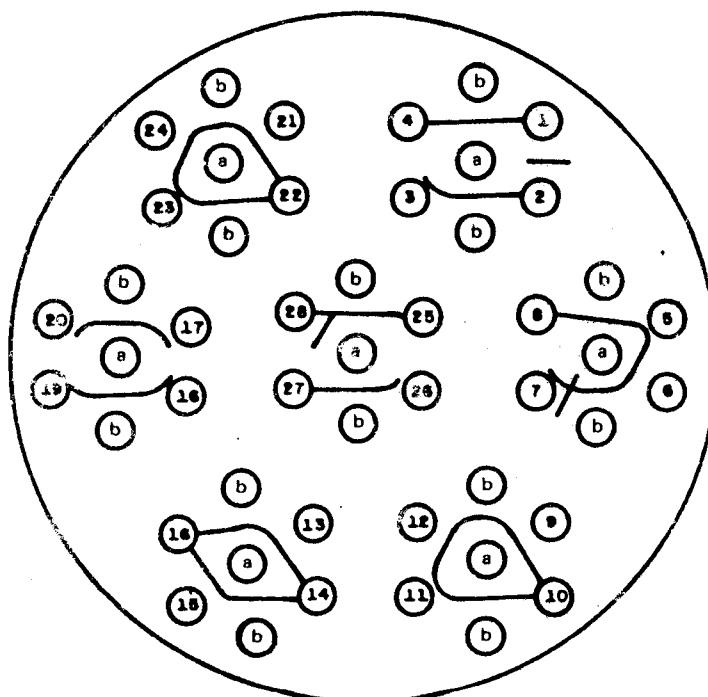
**Sera Analysis:** The sera to be examined are recorded, appropriately numbered and placed in well identified plates. The sera are distributed in clockwise sequence in the molds and on the plate. Four undiluted sera placed in four ring

wells of each mold. The PCS is placed in the two remaining wells. The Ag is deposited in the central well, as shown in Fig. 2. The plates are then immediately incubated at room temperature on a level table.

**Reading the Plates:** The plates are placed over an indirect light source with a black background and read from 24 to 48 hours after the reagents were placed on the plates. During this time the precipitation lines are clear. Readings taken after 48 hours are difficult to interpret because the lines become diffused.

When working with very hemolyzed sera or sera having high concentrations of lipides, or other substances, nonspecific diffusions sometimes appear and may interfere with the reading. This problem can be solved by washing the agar gel with a 10x physiological solution before conducting the reading.

**FIGURE 2. Distribution of sera to analyzed, Ag and PCS on a Petri plate and their reaction**



a and b = Ag and PCS, respectively.  
1 to 28 = Test sera.

**TABLE 1. Interpretation of the reactions provided by the sera analyzed in Fig. 2**

No. serum	Result	No. serum	Result
1	-	15	++
2	-	16	-
3	+	17	+
4	-	18	+
5	+	19	?
6	++	20	+
7	+	21	++
8	-	22	-
9	++	23	+
10	-	24	++
11	+	25	?
12	++	26	+
13	++	27	-
14	-	28	-

- negative, + positive,  
++ intense positive, ? dubious.

## RESULTS

All the sera to be examined are contiguous to PCS. This enables the observer to see whether the originated precipitation lines maintain identity with the PCS precipitation line. It should be remembered that some sera yield lines or reactions with identity or nonspecific for BT Ag, that cross or touch the specific precipitation line originated by the BT Ag and PCS (see Fig. 2 and Table 1):

(a) **Negative Serum (-)**: These are those in the line of reference, that is, the line originated by the Ag and the PCS enter the well of the serum under study.

(b) **Positive Serum (+)**: The reference line shows a slight curvature near the serum under study.

(c) **Intense Positive Serum (++)**: The situation and appearance of the precipitation line originated by the serum under study are similar in intensity to the PCS line.

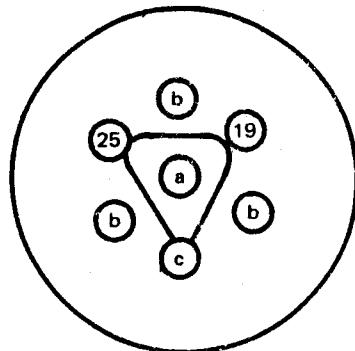
(d) **Dubious Serum (?)**: The sera that for any reason can not be classed as -, + or ++, are re-examined using the following procedure:

**Repetition of the Dubious Sera.** These are retested by IDAG. The PCS is placed in three alternate wells of the ring of wells, the dubious sera in two remaining wells, and a negative serum in the third well. In this way the reaction in the two contiguous reference lines is observed and compared with the negative serum (see Fig. 3).

The interpretation is conducted as indicated in the preceding section.

When sera again do not yield results enabling them to be classed in category + or -, it is advisable to repeat the test with a new serum.

**FIGURE 3. Analysis of sera that provided dubious results in the test shown in Fig. 2 (sera No. 19 and 25)**



a and b = Ag and PCS, respectively.

c = Negative control serum.

19 and 25 = Sera under study (19+ and 25?).

Request new sample serum No. 25.

## REFERENCES

1. GROOCOCK, C.M., CAMPBELL, C.H. Isolation of an exotic serotype of bluetongue virus from imported cattle in quarantine. *Can. S. Comp. Med.*, 46:160-164, 1982.
2. OBDEYN, I.M. Bluetongue. A review of the disease. Rio de Janeiro, Pan American Foot-and-Mouth Disease Center, 1987. (*Scien. Tech. Monog.*, 16).

**DESARROLLO DE UN METODO MAS SIMPLE Y RAPIDO  
PARA EL ANALISIS BIDIMENSIONAL DE OLIGONUCLEOTIDOS  
DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA: MINIFINGERPRINTING DE ARN**

*I.E. Bergmann<sup>1</sup>, B.H. Tiraboschi<sup>1</sup>, M.A. Affonso Boller<sup>1</sup>,  
V. Malirat<sup>1</sup>, P.J.V. Pereira<sup>1</sup>, P. Augé de Mello<sup>1</sup>*

**COMUNICACION BREVE**

Una característica significativa del virus de la fiebre aftosa (VFA) es su alto grado de variabilidad, lo cual constituye un importante obstáculo para el control de la enfermedad (9). El éxito de los programas de inmunización depende, en parte, de una caracterización precisa de las cepas que circulan en el campo y de la evaluación de sus semejanzas con las cepas de los virus que se incluyen en las vacunas.

Actualmente se dispone de varias técnicas bioquímicas como fingerprinting de ARN (3, 4), ADN recombinante (8) y secuenciamiento rápido (10) para estudiar, con significativa precisión, las características genéticas de las cepas virales. La técnica de fingerprinting resulta muy adecuada para evaluar las relaciones evolutivas entre cepas virales muy relacionadas (5, 6, 7, 12) y en el caso del VFA también se ha probado su utilidad para fines de diagnóstico (1, 2).

Con la creciente aplicación de estudios epidemiológicos a nivel molecular que requieren el análisis de un gran número de muestras, se hace evidente que el empleo de técnicas más prácticas y rápidas y de menor costo, sería de gran utilidad para la caracterización del ARN genómico.

En este sentido, se observó que el uso de ARN inducido 35S produce un perfil de oligonucleótidos resistentes a la ARNasa T<sub>1</sub> idéntico al del ARN extraído de la partícula viral (11). Con el mismo objetivo se utilizaron mapas monodimensionales de oligonucleótidos resistentes a la ARNasa T<sub>1</sub> y efectivamente éstos demostraron ser un valioso método para diferenciar cepas virales (11). Sin embargo esta técnica, en la cual los oligonucleótidos se separan solo por tamaño, no es apropiada para establecer relaciones evolutivas entre cepas muy relacionadas.

En este artículo describimos una modificación de la técnica de fingerprinting convencional que consiste en utilizar geles más finos y más pequeños para resolver los digestos de la ARNasa T<sub>1</sub>. Los perfiles de oligonucleótidos obtenidos de esta manera comparados a los obtenidos con la técnica convencional son equivalentes en cuanto a su resolución. Los cambios introducidos disminuyen considerablemente la cantidad de materiales, tiempo y trabajo requeridos y por lo tanto resultan muy adecuados para la rápida caracterización de cepas.

La preparación de ARN marcado con <sup>32</sup>P de citoplasma de células infectadas se realizó básicamente como se describió anteriormente (1), excepto que la cantidad de material requerida fue significativamente menor. En resumen, se infectan frascos Falcon de 25 cm<sup>2</sup> conteniendo aproximadamente  $7 \times 10^6$  células BHK<sub>21</sub> o alternativamente cajas de Petri de 8 cm<sup>2</sup> conteniendo  $2,4 \times 10^6$  células BHK<sub>21</sub>, a alta multiplicidad de infección (mayor que 10). Luego de 30 minutos de adsorción, se descarta el virus y las monocapas se lavan con medio precalentado sin fosfato, realizándose tres cambios de medio durante 45

<sup>1</sup> Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (PANAFTOSA, HPV/OPS/OMS), Caixa Postal 589, 20001 Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

minutos a 37°C. Después del último lavado, se agrega medio sin fosfato que contiene 5 µg/ml de actinomicina D. Luego de 30 minutos se marca la monocapa celular con 200 µCi/ml de ácido ortofósforico [<sup>32</sup>P] y se deja proseguir la infección hasta que la mayoría de las células estén redondeadas lo cual, dependiendo de la cepa utilizada, ocurre entre las 5 y 7 h posinfección. Se descarta el medio y se rompen las células con buffer NET (0,05M Tris-HCl pH: 7,5; 0,10M NaCl y 0,001M EDTA que contiene 0,05% Triton X-100), agitando vigorosamente durante 5 minutos en frío.

Las células lisadas se centrifugan a 4°C durante 3 minutos a 1000 x g con el fin de separar los núcleos. Los sobrenadantes se llevan a una concentración final de 1% de SDS (dodecilo sulfato de sodio) y se realiza una doble extracción del ARN con fenol-cloroformo.

Se precipita el ARN a partir de la fase acuosa agregando dos volúmenes de etanol y dejándolo por lo menos 4 h a -20°C, luego se disuelve el precipitado en buffer acetato de sodio 0,3M pH: 5,0 y se precipita dos veces con un volumen igual de CILi 4,4M durante por lo menos 3 h a 4°C. Se centrifuga el ARN y el precipitado se disuelve en buffer acetato de sodio 0,3M pH: 5,0 reprecipitándolo posteriormente con etanol. Los precipitados se lavan dos veces con etanol 70%, se secan con vacío, seredisuelven en buffer T<sub>1</sub> (0,02M Tris-HCl pH: 7,5; 0,002M EDTA), se digieren durante 1 h a 37°C con ARNasa T<sub>1</sub> (Pharmacia P-L Biochemicals) en una relación enzima/substrato de 1:5 y finalmente se agrega un volumen igual de buffer de muestra (6M urea, 50% sacarosa, 0,2% de azul de bromofenol y 0,2% de xilene-cianol). Se observó que no es necesaria la presencia en este buffer, de 15 mg/ml de ARN de transferencia de *Escherichia coli* como fue descripto anteriormente (11).

La electroforesis en slab de la primera y segunda dimensión se realiza a temperatura ambiente. El tamaño de los geles utilizados en este procedimiento es de 20 cm x 15 cm para la primera dimensión y de 15 cm x 15 cm para la segunda dimensión. El espesor de los mismos es de 0,75 mm.

La composición del gel de la primera dimensión es la siguiente: 10% acrilamida (acrilamida/bisacrilamida, 40/1,3); 6M urea; 0,025M ácido cítrico, pH: 3,2. Inmediatamente antes de verter 50 ml de la solución en la celda del gel, se agrega, para su polimerización, los siguientes catalizadores: 180 µl de ácido ascórbico 10%, 180 µl de sulfato ferroso 0,25% y 3,5 µl de peróxido de hidrógeno 30%. En el buffer de corrida compuesto por una solución de ácido cítrico 0,025M, pH: 3,2, la urea no es necesaria. Normalmente en un gel de primera dimensión se corren 4 muestras simultáneamente.

Las muestras se siembran calle por medio, lavando y llenándolas previamente con una solución de ácido cítrico 0,025M, pH: 3,2 y urea a una concentración final de 6M. La electroforesis se realiza a 25 mA a corriente constante durante aproximadamente 1 h, tiempo en el cual el colorante azul de bromofenol migra aproximadamente 8 cm.

Al finalizar la corrida, se retira un vidrio del gel y se cubre el mismo con una envoltura plástica con el fin de facilitar el trazado de los bordes de la tira de primera dimensión y lograr, al cortarla con una hoja afilada de bisturí, bordes parejos (no rugosos). Las dimensiones de las tiras de primera dimensión son de 13 cm x 2 cm. La tira cortada del gel ácido se lava rápidamente dos veces con buffer TBE (0,1M Tris-HCl, pH: 8,3; 0,1M ácido bórico, 0,002M EDTA) y luego se coloca a 2,5 cm por encima del borde inferior del vidrio de la segunda dimensión.

La composición del gel de la segunda dimensión es la siguiente: 20% acrilamida (acrilamida/bisacrilamida, 40/2,6), 0,1M Tris-HCl, pH: 8,3; 0,1M ácido bórico; 0,002M EDTA y los catalizadores utilizados son: 0,015 g de persulfato de amonio y 15 µl de TEMED (N, N, N', N' – Tetrametiletilendiamina) para una mezcla de gel de 30 ml.

La electroforesis se realiza en sentido superior a 25 mA en condiciones de corriente constante y se interrumpe cuando el azul de bromofenol migra 12 cm.

Los geles se fijan con una solución 50% metanol-7,5% ácido acético, se cubren con una envoltura plástica y se exponen dentro de un cassette Dupont con un film Fuji X-ray y una parilla amplificadora Cronex. La exposición se realiza a -70°C. Las muestras que contienen 100.000 cpm

presentan un perfil claramente visible luego de una exposición de aproximadamente 17 h.

La Figura 1 muestra un típico mapa de oligonucleótidos obtenido bajo las condiciones aquí descriptas. Se observa que los geles más pequeños tienen una resolución similar a la de los geles de tamaño convencional (1). Incluso los oligonucleótidos de migración muy cercana entre sí, en los geles mayores, se resuelven en los menores.

El uso de un sistema así simplificado permite el análisis mediante fingerprinting de una considerable cantidad de muestras de ARN en un

tiempo menor que el utilizado anteriormente con la técnica convencional y hace que estas modificaciones sean muy adecuadas no solo para diagnóstico y estudios epidemiológicos sino también para estudios de evolución viral.

#### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Sr. Ronaldo Albuquerque por su asistencia técnica y a la Sra. Carla Prete por la mecanografía del manuscrito.

**FIGURA 1.** Perfil de oligonucleótidos ARNasa T<sub>1</sub> resistentes de una variante de la cepa O<sub>1</sub>, Campos. El fingerprinting se realizó como se describe en el texto y la figura representa el tamaño original del gel



**REFERENCIAS**

1. AUGÉ DE MELLO, P., CASAS O., R., COSTA GIOMI, M.P., ALONSO F., A., SCODELLER, E.A., TORRE, J.L. La, BERGMANN, I.E. RNA fingerprinting of South American prototype aphthovirus strains. *Vaccine*, 4:105-110, 1986.
2. BERGMANN, I.E., TIRABOSCHI, B., MAZZUCA, G., FERNANDES, E., MICHAIOFF, C.A., SCODELLER, E.A., TORRE, J.L. La. Serological and biochemical analysis of foot-and-mouth disease virus (serotype C<sub>3</sub>) isolated in Argentina between 1981 and 1986. *Vaccine*, 6:245-252, 1988.
3. BISHOP, D.H.L. The application of RNA fingerprinting and sequencing to viral diagnosis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 104:259, 1983.
4. CLEWLEY, J.P., BISHOP, D.H.L. Oligonucleotide fingerprinting of viral genomes. In: *New Developments in Practical Virology*. Lis, New York, Ed. Howard C., 1982. p.231.
5. CLEWLEY, J.P., BISHOP, D.H.L., KANG, C.Y., COFFIN, J., SCHNITZLEIN, W.M., REICHMANN, M. E., SCHOPE, R.E. Oligonucleotide fingerprints of RNA species obtained from rhabdoviruses belonging to the vesicular stomatitis virus subgroup. *J. Virol.*, 23:152-166, 1977a.
6. CLEWLEY, J.P., GENTSCH, J., BISHOP, D.H.L. Three unique viral RNA species of snowshoe hare and La Crosse bunyaviruses. *J. Virol.*, 22:459-468, 1977b.
7. COELEN, R.J., MACKENZIE, J.S. Genetic variation of Murray valley encephalitis virus. *J. gen. Virol.*, 69:1903-1912, 1988.
8. GOULD, A.R., SYMONS, R.H. A molecular biological approach to relationships among viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 21:179, 1983.
9. HOLLAND, J., SPINDLER, K., HORODYSKI, F., GRABAA, E., NICHOL, S., VANDE POL, S. Rapid evolution of RNA genomes. *Science*, 215, 1982.
10. ROWLANDS, D.J., CLARKE, B.E., CARROLL, A.R., BROWN, F., NICHOLSON, B.H., BITTLE, J.L. et al. Chemical basis of antigenic variations in foot-and-mouth disease virus. *Nature*, 306:894, 1983.
11. TORRE, J.L. La, UNDERWOOD, B.O., LEBENDIKER, M.A., GORMAN, B.M., BROWN, F. Application of RNase T<sub>1</sub> one and two-dimensional analyses to rapid identification of foot-and-mouth disease virus. *Infect. Immun.*, 36:143, 1982.
12. TRENT, D.W., GRANT, J.A., ROSEN, L., MONATH, T.P. Genetic variation among Dengue 2 viruses of different geographic origin. *Virology*, 128:271-284, 1983.

**DEVELOPMENT OF A MORE RAPID AND SIMPLE PROCEDURE  
FOR TWO-DIMENSIONAL OLIGONUCLEOTIDE ANALYSIS  
OF FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS: RNA MINIFINGERPRINTING**

*I.E. Bergmann<sup>1</sup>, B.H. Tiraboschi<sup>1</sup>, M.A. Affonso Boller<sup>1</sup>*

*V. Malirat<sup>1</sup>, P.J.V. Pereira<sup>1</sup>, P. Augé de Mello<sup>1</sup>*

**BRIEF REPORT**

An outstanding characteristic of foot-and-mouth disease virus (FMDV) is its high degree of variability, which constitutes an important obstacle for the control of the disease (9). The success of immunization programs is partly dependent upon precise characterization of the strains circulating in the field and upon the evaluation of their similarities with the strains of virus included in vaccines.

Several biochemical techniques such as RNA fingerprinting (3, 4), recombinant DNA (8) and rapid sequencing (10) are now available to study with significant precision, the genetic characteristics of strains. Oligonucleotide fingerprinting has been especially useful to evaluate the evolutionary relationships among closely related RNA viruses (5, 6, 7, 12) and in the case of FMDV its application for diagnostic purposes has also been demonstrated (1, 2).

With the increasing application of molecular epidemiological studies, which requires the analysis of large number of samples, it becomes apparent that more practical, rapid and cheaper techniques for characterizing the genomic RNA should be valuable.

In this regard it has been shown that the use of 35S induced RNA instead of the virus particle RNA gave indistinguishable T<sub>1</sub> fingerprint patterns on two-dimensional (2D) gels (11). One-dimensional T<sub>1</sub> maps have also been attempted as a way of simplifying diagnostic procedures, and in fact have been shown to provide a valuable screening method for distinguishing between viruses (11). However, this method in which the RNase T<sub>1</sub> oligonucleotides are separated only according to size, is not suited for establishing evolutionary relationships among closely related strains.

In this paper we describe a modification of the conventional oligonucleotide fingerprinting technique using thinner and smaller gels to resolve the RNase T<sub>1</sub> digests. Compared to the conventional system the fingerprint patterns obtained are of equivalent resolution. The changes introduced save considerably on materials, time and labor, therefore providing a practical approach for the rapid biochemical characterization of strains.

Preparation of <sup>32</sup>P-labeled RNA from the cytoplasm of infected cells was basically as reported before (1) except that significant less material was required. Briefly, 25 cm<sup>2</sup> Falcon flasks containing approximately 7 × 10<sup>6</sup> BHK<sub>21</sub> cells or alternatively 8 cm<sup>2</sup> Petri dishes containing 2.4 × 10<sup>6</sup> BHK<sub>21</sub> cells were infected with FMDV at high multiplicity (higher than 10). After 30 minutes adsorption the virus was removed and the monolayers washed with prewarmed phosphate-free medium (three changes during 45 minutes at 37°C). After the last wash, medium containing 5 µg of actinomycin D per ml was added during 30 minutes. Infected cell monolayers were then

<sup>1</sup> Pan American Foot-and-Mouth Disease Center, (PANAFTOSA, HPV/PAHO/WHO), Caixa Postal 589, 20001 Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

labeled with 200  $\mu$ Ci of [ $^{32}$ P] orthophosphoric acid per ml and incubated further until most of the cells were rounded which was usually between 5 and 7 h postinfection depending on the strain of virus used. The medium was poured off, and the cells were disrupted in NET buffer (0.05 M Tris-HCl pH: 7.5, 0.10 M NaCl and 0.001 M EDTA containing 0.05% Triton X-100) in the cold through vigorously shaken for 5 minutes.

Cell lysates were centrifuged at 4°C for 3 minutes at 1000  $\times g$  to pellet the nuclei. Supernatants were made 1% with respect to SDS (sodium dodecyl sulfate) and the RNA was extracted twice with phenol-chloroform.

The RNA was precipitated from the aqueous phase by the addition of 2 volumes of ethanol, kept for at least 4 h at -20°C, dissolved in 0.3 M sodium acetate buffer pH: 5.0 and precipitated twice with an equal volume of 4.4 M LiCl for at least 3 h at 4°C. RNA precipitates were centrifuged, dissolved in 0.3 M sodium acetate buffer pH: 5.0 and reprecipitated with ethanol. The RNA precipitates were washed twice with 70% ethanol, dried in vacuo, redissolved in T<sub>1</sub> buffer (0.02 M Tris-HCl pH: 7.6, 0.002 M EDTA), digested for 1 h at 37°C with RNase T<sub>1</sub> (Pharmacia P-L Biochemicals) at an enzyme/substrate ratio of 1:5, and finally an equal volume of dye marker mixture was added (6 M urea, 50% sucrose, and 0.2% each of bromophenol blue and xylene cyanol). The presence in the sample buffer of 15 mg of *Escherichia coli* transfer RNA per ml described previously (11) was shown not to be necessary.

Slab electrophoresis in the first and second dimension was performed at room temperature. Actual gel dimensions are 20 cm by 15 cm for the first dimension and 15 cm by 15 cm for the second dimension. A gel thickness of 0.75 mm was used in this procedure.

First dimension gels were composed of 10% acrylamide (acrylamide/bisacrylamide ratio of 40 to 1.3), 6 M urea, 0.025 M citric acid, pH: 3.2. The catalyst composed of 180  $\mu$ l of 10% ascorbic acid, 180  $\mu$ l of 0.25% ferrous sulfate and 3.5  $\mu$ l of 30% hydrogen peroxide was added immediately before the 50 ml mixture is poured into the gel cell for polymerization. Urea was not necessary in the buffer in the reservoirs which was com-

posed of 0.025 M citric acid, pH: 3.2. We routinely separated 4 samples on a single first dimension gel.

Samples were loaded into every other well previously washed and filled with 0.025 M citric acid, pH: 3.2, containing 6 M urea and electrophoresed at 25 mA at constant current for about 1 h, by which time the bromophenol blue dye had migrated approximately 8 cm.

After separation was complete a glass plate was removed and a sheet of plastic wrap was placed onto the gel in order to facilitate the drawing of an outline of the gel strip to be excised and to improve the smoothness of the cut edges after excision of gel strips with a sharp scalpel blade. The first dimension gel strips have the dimensions of 13 cm by 2 cm. The strip excised from the acid gel was briefly washed twice in TBE buffer (0.1 M Tris-HCl, pH: 8.3, 0.1 M boric acid, 0.002 M EDTA), and then placed approximately 2.5 cm above the bottom edge of the glass plate for the second dimension separation.

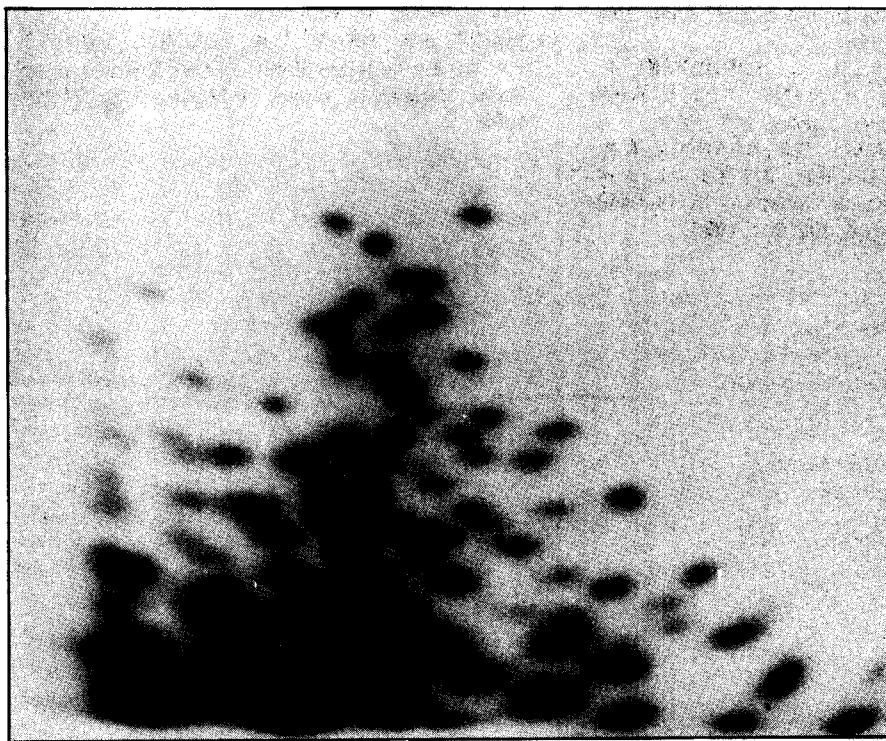
The gel composition for the second dimension separation was 20% acrylamide (acrylamide/bisacrylamide ratio of 40 to 2.6), 0.1 M Tris-HCl, pH: 8.3, 0.1 M boric acid, 0.002 M EDTA, using as catalytic agent 0.015 g ammonium persulfate and 15  $\mu$ l TEMED (N,N,N',N' – Tetramethyl-ethylenediamine) for a total gel mixture of 30 ml.

Electrophoresis was carried out upwards at 25 mA constant current and it was terminated when the leading bromophenol blue had migrated 12 cm.

The gels were then fixed in 50% methanol 7.5% acetic acid, covered with plastic wrap, and placed in a Dupont cassette with Fuji X-ray film and a Cronex Lightning Plus screen. Exposure was carried out at -70°C. Samples containing 100,000 cpm gave clearly visible spots after approximately 17 h exposure.

Figure 1 shows a typical fingerprint pattern obtained under the conditions described. As observed the smaller gels are of similar resolution when compared to the patterns obtained with the larger conventional sized gels (1). Even oligonucleotides that migrate very closely in the larger gels, are resolved in the smaller gels.

**FIGURE 1. T<sub>1</sub> oligonucleotide fingerprint pattern of RNA of a variant of strain O<sub>1</sub> Campos. Oligonucleotide fingerprinting was performed as described in the text and the figure represents the original dimension of the gel**



The use of such simplified system enables one to fingerprint multiple RNA samples in a considerable short time and therefore are quite suitable for diagnosis, epidemiological studies as well as for studies of viral evolution.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank Mr. Ronaldo Albuquerque for his technical assistance and Miss Carla Prete for her excellent secretarial assistance.

#### REFERENCES

1. AUGÉ DE MELLO, P., CASAS O., R., COSTA GIOMI, M.P., ALONSO F., A., SCODELLER, E.A., TORRE, J.L., La, BERGMANN, I.E. RNA fingerprinting of South American prototype aphthovirus strains. *Vaccine*, 4:105-110, 1986.
2. BERGMANN, I.E., TIRABOSCHI, B., MAZZUCA, G., FERNANDES, E., MICHAIOFF, C.A., SCODELLER, E.A., TORRE, J.L. La. Serological and biochemical analysis of foot-and-mouth disease virus (serotype C<sub>3</sub>) isolated in Argentina between 1981 and 1986. *Vaccine*, 6:245-252, 1988.
3. BISHOP, D.H.L. The application of RNA fingerprinting and sequencing to viral diagnosis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 104:259, 1983.
4. CLEWLEY, J.P., BISHOP, D.H.L. Oligonucleotide fingerprinting of viral genomes. In: *New Developments in Practical Virology*. Lis, New York, Ed. Howard C., 1982. p.231.
5. CLEWLEY, J.P., BISHOP, D.H.L., KANG, C.Y., COFFIN, J., SCHNITZLEIN, W.M., REICHMANN, M. E., SCHOPE, R.E. Oligonucleotide fingerprints of RNA species obtained from rhabdoviruses belonging to the vesicular stomatitis virus subgroup. *J. Virol.*, 23:152-166, 1977a.
6. CLEWLEY, J.P., GENTSCH, J., BISHOP, D.H.L. Three unique viral RNA species of snowshoe hare and La Crosse bunyaviruses. *J. Virol.*, 22:459-468, 1977b.

7. COELEN, R.J., MACKENZIE, J.S. Genetic variation of Murray valley encephalitis virus. *J. gen. Virol.*, 69:1903-1912, 1988.
8. GOULD, A.R., SYMONS, R.H. A molecular biological approach to relationships among viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 21:179, 1983.
9. HOLLAND, J., SPINDLER, K., HORODYSKI, F., GRABAA, E., NICHOL, S., VANDE POL, S. Rapid evolution of RNA genomes. *Science*, 215, 1982.
10. ROWLANDS, D.J., CLARKE, B.E., CARROLL, A.R., BROWN, F., NICHOLSON, B.H., BITTLE, J.L. *et al.* Chemical basis of antigenic variations in foot-and-mouth disease virus. *Nature*, 306:894, 1983.
11. TORRE, J.L. La, UNDERWOOD, B.O., LEBENDIKER, M.A., GORMAN, B.M., BROWN, F. Application of RNase T<sub>1</sub> one and two-dimensional analyses to rapid identification of foot-and-mouth disease virus. *Infect. Immun.*, 36:143, 1982.
12. TRENT, D.W., GRANT, J.A., ROSEN, L., MONATH, T.P. Genetic variation among Dengue 2 viruses of different geographic origin. *Virology*, 128:271-284, 1983.

## RESUMENES

### ABSTRACTS

BERGMANN, I.E., TIRABOSCHI, B., MAZZUCA, G., FERNANDEZ, E., MICHAIOFF, C.A., SCODELLER, E.A., TORRE, J.L. La.

Texto en inglés. *Vaccine*, 6(3):245-252, 1988. Centro de Virología Animal (CEVAN), Serrano 661, 1414 Cap. Fed., Argentina.

**Análisis serológico y bioquímico del aftovirus (serotipo C<sub>3</sub>) aislado en Argentina entre 1981 y 1986**

Se describe la evolución en el campo de los aftovirus del serotipo C<sub>3</sub> en Argentina entre 1981 y 1986. En 1981-82, solo se registraron tres aislamientos de este serotipo, los cuales mostraron mínimas variaciones serológicas y bioquímicas de las del prototipo de la cepa C<sub>3</sub> Resende-Brasil/55. Al inicio de 1983 se detectó un brote en una región geográfica restringida, causado por cepas que tenían diferencias serológicas y bioquímicas importantes de la cepa prototipo. La revacunación de animales con una vacuna comercial disponible fue suficiente para controlar la enfermedad. En 1984 hasta 1986 ocurrió un nuevo brote del mismo serotipo, en una región geográfica extensa de la Argentina. Durante ese brote se aislaron y estudiaron dos cepas de campo que luego fueron incluidas en la vacuna. Una de ellas, la cepa C-84, fue una variante serológica de la cepa prototipo y su inclusión en la vacuna solo tuvo un efecto limitado en el control de la enfermedad. La inclusión de la cepa C-85, junto con el virus C-84, finalmente redujo los brotes al número comúnmente comunicado.

**Serological and biochemical analysis of foot-and-mouth disease virus (serotype C<sub>3</sub>) isolated in Argentina between 1981 and 1986**

The evolution in the field is described for foot-and-mouth disease viruses belonging to serotype C<sub>3</sub> in Argentina between 1981 and 1986. During 1981 and 1982 only three isolations of this serotype took place, which showed minor serological and biochemical variations from the prototype strain C<sub>3</sub> Resende-Brasil/55. At the beginning of 1983 an outbreak was detected in a restricted geographical region caused by strains which had important serological and biochemical differences from the prototype strain. However, revaccination of the animals with the available commercial vaccine was sufficient to control the disease. During 1984 and up to 1986, a new outbreak of the same serotype took place in an extended geographical region of Argentina. During this outbreak, two field strains were isolated, studied and later included in the vaccine. One of them, strain C84, was a serological variant of the prototype strain and its inclusion in the vaccine had only a limited effect in controlling the disease. Inclusion of the other representative strain, C85, together with virus C84 finally reduced the number of outbreaks to the usual number reported.

BROWN, F.

Texto en inglés. *Vaccine*, 6(2):180-182, 1988. Wellcome Biotechnology Ltd., Pirbright, Surrey GU24 0NQ, UK.

**El uso de péptidos para la inmunización contra la fiebre aftosa**

El péptido correspondiente al sitio inmunogénico principal de la proteína VP1 del aftovirus producirá una respuesta de anticuerpos neutralizantes protectores en cobayos, bovinos y cerdos.

**Use of peptides for immunization against foot-and-mouth disease**

A peptide corresponding to the major immunogenic site of the protein VP1 of foot-and-mouth disease virus (FMDV) will elicit a protective neutralizing antibody response in guinea-pigs,

La respuesta es mayor cuando el péptido es presentado como un dímero lineal o tetramero y los cerdos que recibieron solo 40ug fueron protegidos contra la infección por desafío. Se obtuvo una respuesta aún mayor cuando el péptido es presentado como parte de la proteína interna del virus de hepatitis B. Además, la sensibilidad al péptido en ratones no susceptibles puede ser estimulada por la inoculación simultánea de un epítope de la célula T adecuado, unido a un péptido del aftovirus.

cattle and pigs. The response is much greater when the peptide is presented as a linear dimer or tetramer and pigs receiving as little as 40ug peptide have been protected against challenge infection. An even greater response is obtained when the peptide is presented as part of the core protein of hepatitis B virus. Moreover, responsiveness to the peptide in non-responder mice can be stimulated by the simultaneous inoculation of an appropriate T-cell epitope linked to the FMDV peptide.

**BUONAVOGLIA, C., Di TRANI, L., GRAMENZI, F., ZOLETTO, R., LELLI, R., SCACCHIA, M.**

Texto en inglés. *J. Vet. Med. B*, 35(6):397-401, 1988. In: *Vet. Bull.*, 58(12):7594, 1988. Ist. Superiore di Sanità, Viale Regina Elena, 299, 00161-Roma, Italia.

**Duración de la inmunidad en porcinos inoculados con una vacuna antiaftosa de emulsión oleosa**

La duración de la inmunidad fue medida durante un período de siete meses en cerdos vacunados con una vacuna antiaftosa monovalente inactivada con formalina y bromoetilenimina, combinada con un adyuvante oleoso. Se informó un grado de inmunidad satisfactorio al mes de la posvacunación y los niveles de anticuerpos se mantuvieron durante el período del experimento. La vacuna también produjo una buena protección al desafío, aun después de siete meses tras una única vacunación.

**Duration of immunity in swine inoculated with a monovalent foot-and-mouth disease oil emulsion vaccine**

The duration of immunity was measured for a period of seven months in pigs vaccinated with a monovalent foot and mouth disease vaccine inactivated with formalin and bromoethylenimine, combined with an oil adjuvant. A satisfactory degree of immunity was recorded at one month post-vaccination and the antibody levels were sustained for the period under study. The vaccine also induced a good protection to the challenge even after seven months following a single administration of the vaccine.

**COSTA GIOMI, M.P., GOMES, I., TIRABOSCHI, B., AUGÉ DE MELLO, P., BERGMANN, I.E., SCODELLER, E.A., TORRE, J.L. La.**

Texto en inglés. *Virology*, 162(1):58-64, 1988. Centro de Virología Animal (CEVAN), Serrano 661, 1414 Cap. Fed., Argentina.

**Heterogenicidad del tracto del ácido poliribocitidílico en aftovirus: cambios en el tamaño del poli(C) de virus recuperados de bovinos infectados persistentemente**

Una muestra del aftovirus tipo C3 Resende con dos tructos de ácidos poliribocitidílicos —poli(C)— fue clonada en cultivo de tejidos. Un clon de poli(C) con cerca de 145 nucleótidos (clon 3B), otro con cerca de 230 nucleótidos (clon 12) y una mezcla de ambos fue inoculada por vía intralingual en tres novillos. Se recogieron muestras de los tres animales durante la fase aguda de la enfermedad, de la sangre y patas, y de los líquidos esofágico-faríngeos (LEF) durante varios días después de la

**Heterogeneity of the polyribocytidilic acid tract in aphthovirus: changes in the size of the poly(C) of viruses recovered from persistently infected cattle**

A sample of aphthovirus type C3 strain Resende carrying two polyribocytidilic acid —poly(C)— tracts was cloned in tissue culture. One clone with a poly(C)-rich tract of about 145 nucleotides long (clone 3B) and another with a poly(C)-rich tract of about 230 nucleotides long (clone 12) and a mixture of both were injected intralingually into three steers. Samples from all three animals were recovered during the acute phase of the disease, from the blood and from the feet, and at various

inoculación. El análisis de los ARNs virales de las muestras positivas por medio de mapas RNase T1 en geles mono y bidimensionales mostró: 1) cambios en la movilidad electroforética del poli(C) de los virus recuperados de los LEF durante varios períodos después de la infección; 2) selección de poblaciones virales con poli(C) de tamaño aumentado; 3) más tarde, cambios en las formas de los oligonucleótidos de virus persistentes. Estas variaciones pueden conducir a la producción de nuevas cepas con propiedades biológicas alteradas que contribuyen al mantenimiento y difusión de estos virus en el campo.

days after inoculation from the oesophageal-pharyngeal (OP) fluids. Analysis of the viral RNAs of the positive samples by means of RNase T1 maps on one- and two-dimensional gels showed (1) changes in the electrophoretic mobility of the poly(C)-rich tracts of viruses recovered from the OP fluids at various times after infection; (2) selection of virus populations with poly(C)-rich tracts of increased size; (3) later on, changes in the patterns of oligonucleotides of persistent viruses. These variations may lead to the production of new strains with altered biological properties that may contribute to the maintenance and spread of these viruses in the field.

DEVANEY, M.A., VAKHARIA, V.N., LLOYD, R.E., EHRENFIELD, E., GRUBMAN, M.J.

Texto en inglés. *J. Virol.*, 62(11):4407-4409, 1988. USDA, ARS, Plum Island Animal Disease Center, P.O.Box 848, Greenport, NY 11944, USA.

**La proteína principal del aftovirus es necesaria para cortar el componente p220 del complejo proteínico de unión de la cobertura**

La supresión de la síntesis de la proteína huésped en células infectadas con poliovirus y otros picornavirus involucra la inactivación del complejo proteínico de unión de la cobertura. La inactivación de este complejo ha sido correlacionada con el corte proteolítico del p220. Puesto que el ARN del picornavirus no está cubierto, continúa siendo traducido mientras el complejo proteínico de unión de la cobertura es inactivado. El corte del p220 puede ocurrir *in vitro*, catalizado por extractos de células infectadas o por translación de lisados de reticulocitos del ARN viral. La expresión de la proteasa polioviral 2A es suficiente para producir el corte del p220 y la presencia en 2A de una secuencia de 18 aminoácidos representando un supuesto sitio de la cisteína proteasa activa, se correlaciona con la habilidad de diferentes picornavirus de producir el corte del p220. La infección por aftovirus produce un corte completo del p220, por lo tanto el genoma del aftovirus codifica para una proteína 2A de solo 16 aminoácidos, sin incluir el sitio de la cisteína proteasa activa. Usando plasmídeos ADNc que codifican varias regiones del genoma del aftovirus, se determinó que la proteína principal es necesaria para iniciar

**Leader protein of foot-and-mouth disease virus is required for cleavage of the p220 component of the cap-binding protein complex**

Suppression of host protein synthesis in cells infected by poliovirus and certain other picornaviruses involves inactivation of the cap-binding protein complex. Inactivation of this complex has been correlated with the proteolytic cleavage of p220, a component of the cap-binding protein complex. Since picornaviral RNA is not capped, it continues to be translated as the cap-binding protein complex is inactivated. The cleavage of p220 can be induced to occur *in vitro*, catalyzed by extracts from infected cells or by reticulocyte lysates translating viral RNA. Expression of polioviral protease 2A is sufficient to induce p220 cleavage, and the presence in 2A of an 18-amino-acid sequence representing a putative cysteine protease active site correlates with the ability of different picornaviruses to induce p220 cleavage. Foot-and-mouth disease virus (FMDV) infection induces complete cleavage of p220, yet the FMDV genome codes for a 2A protein of only 16 amino acids, which does not include the putative cysteine protease active site. Using cDNA plasmids encoding various regions of the FMDV genome, we have determined that the leader protein is required to initiate p220 cleavage. This is the first report

el corte del p220. Este es el primer informe de una función para una proteína principal diferente del corte autocatalítico de la poliproteína del aftovirus.

**DOEL, T.R., GALE, C., BROOKE, G., DiMARCHI, R.**

Texto en inglés. *J. gen. Virol.*, 69(9):2403-2406, 1988. Inst. Anim. Hlth, Pirbright, Woking, Surrey GU24 0NF, UK.

**Inmunización contra la fiebre aftosa con péptidos sintéticos representando la región terminal C del VP1**

Experimentos de desafío con aftovirus en cobayos e inmunoensayos con una serie de péptidos equivalente a cada una o ambas secuencias 141 a 158 y 200 a 213 del VP1 mostraron que la estructura más efectiva, en términos de protección, es en la cual ambos "sitios" estaban presentes con un mínimo de aminoácidos adicionales. Un péptido residual 80 conteniendo los aminoácidos 134 a 213 fue considerablemente menos efectivo que 40 ó 45 péptidos residuales. El sitio principal para la inducción de protección fue en la región 141 a 158. Por lo tanto, la protección con el péptido residual 40 ó 45 no parece deberse a la presencia del anticuerpo dirigido solo a la secuencia 200 a 213. Finalmente, la producción de anticuerpo para el último sitio pareció depender del tamaño del péptido y de la disposición de los "sitios" dentro de él.

of a function for the leader protein, other than that of autocatalytic cleavage from the FMDV polyprotein.

**Immunization against foot-and-mouth disease with synthetic peptides representing the C-terminal region of VP1**

Foot-and-mouth disease virus challenge experiments in guinea pigs and immunoassays with a range of peptides equivalent to either or both the sequences 141 to 158 and 200 to 213 of VP1 showed the most effective structure, in terms of protection to be one in which both 'sites' were present with a minimum of additional amino acids. An 80 residue peptide comprising amino acids 134 to 213 was considerably less effective than 40 or 45 residue peptides. The major site for the induction of protection was deduced to be in the region 141 to 158. Thus, protection with the 40 or 45 residue peptide did not appear to be due to the presence of antibody directed solely to the 200 to 213 sequence. Finally, induction of antibody to the latter site appeared to be dependent on both the size of the peptide and the disposition of 'sites' within it.

**DONALDSON, A.L., LEE, M., SHIMSHONY, A.**

Texto en inglés. *Israel J. Vet. Med.*, 44(2):92-96, 1988. Anim. Virus Res. Inst., Pirbright, Woking, Surrey GU24 0NF, UK.

**Un análisis computarizado de simulación de una posible transmisión por el aire de aftovirus de Jordania a Israel**

Un análisis computarizado de simulación de un brote real de fiebre aftosa que ocurrió en Israel en marzo-abril de 1985 sugiere que el origen del brote podría ser una transmisión por el aire de la cepa O<sub>1</sub> de un brote anterior ocurrido en Jordania. Seis brotes de fiebre aftosa ocurrieron en Jordania en enero-marzo de 1985, involucrando bovinos y caprinos, mientras que los brotes en Israel ocurrieron en marzo de 1985 en ovinos y en abril de 1985

**A possible airborne transmission of foot and mouth disease virus from Jordan to Israel-A simulated computer analysis**

A simulated computer analysis of an actual outbreak of FMD which occurred in Israel in March and April 1985 suggests that the origin of the Israeli outbreak could have been an airborne transmission of type O<sub>1</sub> strain from a preceding outbreak in Jordan. Six outbreaks of FMD occurred in Jordan in January-March 1985, involving cattle and goats, while FMD outbreaks in Israel occurred in March 1985 in sheep and in April

en gacelas. Se concluyó que cerdos infectados fueron la probable fuente de infección. Jordania no tiene industria de cerdos pero varios cerdos salvajes son encontrados en el noroeste del país.

1985 in gazelles. It was concluded that infected pigs were the probable source of infection. Jordan has no pig industry, but many wild boars are found in north west Jordan.

**DOPAZO, J., SOBRINO, F., PALMA, E.L., DOMINGO, E., MOYA, A.**

Texto en inglés. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 85(18):6811-6815, 1988. In: *Vet. Bull.*, 59(6):3288, 1989. Lab. Genético, Univ., c/Dr. Moliner 50, 46100, Burjassot, Valencia, España.

**Gene que codifica la proteína VP1 del capsido del aftovirus: un modelo cuasiespecie de evolución molecular**

Se construyó un árbol filogenético relacionado al gene VP1 de 15 aislados de aftovirus de serotipos A, C y O. El árbol más parsimonioso mostró que los subtipos de aftovirus y los aislados dentro de los subtipos constituyeron juegos de genomas relacionados no idénticos, de acuerdo con un modo cuasiespecie de evolución de este virus. El número medio de reemplazo de nucleótidos por sitio para todos los pares posibles de los segmentos de codificación del VP1 es mayor entre los del serotipo A que entre los serotipos C u O. Al comparar las secuencias de aminoácidos, los valores del índice de dispersión (varianza/valor medio) son >1, siendo los valores más altos cuando se consideran todas las secuencias. Esto indica una acumulación de mutaciones en un número limitado de residuos, y sugiere que las distribuciones de secuencias fluctúan alrededor de puntos de estabilidad elevada. La evolución del aftovirus sigue un camino muy distante del de la estrella filogenio, y no ha sido posible hacer conclusiones sobre constancia de tasas de evolución con la prueba aplicada para el análisis. Los aftovirus, como los virus de ARN, son de complejidad genética limitada y sus tamaños de población son muy grandes. Su evolución se relaciona con mezclas complejas e indeterminadas de genomas mas que con una única especie determinada.

**Gene encoding capsid protein VP1 of foot-and-mouth disease virus: a quasispecies model of molecular evolution**

A phylogenetic tree relating the VP1 gene of 15 isolates of foot-and-mouth disease virus (FMDV) of serotypes A, C and O was constructed. The most parsimonious tree showed that FMDV subtypes and isolates within subtypes constituted sets of related, nonidentical genomes, in agreement with a quasispecies mode of evolution of this virus. The average number of nucleotide replacements per site for all possible pairs of VP1 coding segments is higher among representatives of serotype A than serotype C or O. In comparing amino acid sequences, the values of dispersion index (variance/mean value) are >1, with the highest values scored when all sequences are considered. This indicates an accumulation of mutations at a limited number of residues, suggesting that distributions of sequence fluctuate around points of high stability. Evolution of FMDV follows a path very distant from that of a star phylogeny, and it has not been possible to derive conclusions on constancy of evolutionary rates with the test applied to the analysis. FMDVs, as other RNA viruses, are of limited genetic complexity and their population sizes are extremely large. Their evolution concerns complex, indeterminate mixtures of genomes rather than a single, determinate species.

**FRANCIS, M.J., FRY, C.M., ROWLANDS, D.J., BROWN, F.**

Texto en inglés. *J. gen. Virol.*, 69(10):2483-2491, 1988. Dep. Virol., Wellcome Biotech. Ltd., Langley Court, Beckenham, Kent BR3 3BS, UK.

**Diferencias cualitativas y cuantitativas de la respuesta inmunitaria a antígenos del aftovirus y péptidos sintéticos**

En estudios de inmunización cruzada usando antígenos de aftovirus y péptidos sintéticos, de

**Qualitative and quantitative differences in the immune response to foot-and-mouth disease virus antigens and synthetic peptides**

In cross-immunization studies using foot-and-mouth disease virus (FMDV) antigens and a syn-

una región dentro de la cobertura de la proteína viral VP1, se ha demostrado que el virus intacto sensibiliza el sistema inmunitario del virus intacto, de las subunidades virales y del péptido sintético, pero no el virus desintegrado. El péptido sensibilizará para una respuesta al péptido y a las subunidades virales pero no al virus intacto o al virus desintegrado. Estudios en poblaciones de anticuerpos en sueros de antivirus y de antipeptidos demostraron diferencias en la naturaleza de la respuesta de anticuerpos de los dos antígenos. Este resultado se refleja en los estudios de protección, realizados en cobayos inmunizados con partículas virales o péptidos, donde existe una clara correlación entre neutralización *in vitro* y protección *in vivo* tras la inmunización con péptidos. Los resultados muestran que existen diferencias cualitativas y cuantitativas importantes en la respuesta inmunitaria de la partícula del aftovirus y el péptido sintético.

thetic peptide, from a region within virus coat protein VP1, it has been shown that intact virus will prime the immune system for intact virus, virus subunits and synthetic peptide but not for disrupted virus. Peptide will prime for a response to peptide and virus subunits but not to intact virus or disrupted virus. Studies on antibody populations in anti-virus and anti-peptide antisera detected differences in the nature of the antibody response to the two antigens. This result is reflected in protection studies carried out on guinea-pigs immunized with virus particles or peptides where there is a clearer correlation between *in vitro* neutralization and protection *in vivo* following peptide immunization. Results show that there are major qualitative and quantitative differences in the immune response to the FMDV particle and synthetic peptide.

GEBAUER, F., TORRE, J.C. de la, GOMES, I., MATEU, M.G., BARAHONA, H., TIRABOSHI, B., BERGMANN, I., AUGÉ DE MELLO, P., DOMINGO, E.

Texto en inglés. *J. Virol.*, 62(6):2041-2049, 1988. E. Domingo, Centro Biol. Moi., Univ. Autónoma, Canto Blanco, 28049 Madrid, España.

**Selección genética y antigenica rápida de variantes de aftovirus durante persistencia en bovinos**

Una evolución rápida de aftovirus ocurrió durante infecciones persistentes en bovinos. El estado de portador fue alcanzado experimentalmente con aftovirus serotipo C<sub>3</sub> purificado en placas. El virus fue recuperado del área esofágico-faríngea de los animales hasta 539 días después de la infección. El análisis de las proteínas del cápside por electro-enfocado y por motilidad electroforética del genoma poli(C) sugirió heterogeneidad en varios aislados y dominio secuencial de subpoblaciones virales. Las secuencias del nucleótido de la región que codifica el VP1 de los clones parientes del aftovirus C<sub>3</sub> y de siete aislados de bovinos portadores mostró mutaciones que representaron tasas de fijación de mutaciones de  $0.9 \times 10^{-2}$  a  $7.4 \times 10^{-2}$  substituciones por nucleótido por año; 59% de los cambios de base llevaron a sustituciones de aminoácidos, algunos de los cuales estaban localizados dentro de los residuos 135 a 151,

**Rapid selection of genetic and antigenic variants of foot-and-mouth disease virus during persistence in cattle**

Rapid evolution of foot-and-mouth disease virus (FMDV) occurred during persistent infections of cattle. The carrier state was established experimentally with plaque-purified FMDV of serotype C<sub>3</sub>. Virus was recovered from the oesophageal-pharyngeal area of the animals up to 539 days after infection. Analysis of capsid proteins by electrofocusing and by electrophoretic mobility of the genomic poly(C)-rich tract suggested heterogeneity in several isolates and sequential dominance of viral sub-populations. Nucleotide sequences of the VP1-coding region of the parental FMDV C<sub>3</sub> clones and of 7 isolates from the carrier cattle showed point mutations that represented rates of fixation of mutations of  $0.9 \times 10^{-2}$  to  $7.4 \times 10^{-2}$  substitutions per nucleotide per year; 59% of the base changes led to amino acid substitutions, some of which were located within residues 135 to 151, a region involved in neutraliza-

una región involucrada en la neutralización del aftovirus. En muestras de líquidos esofágico-faríngeos se encontró actividad neutralizante del aftovirus C<sub>3</sub>. Se comprobaron variaciones antigenicas con anticuerpos monoclonales producidos contra el aftovirus C<sub>3</sub>. Dos aislados de los bovinos portadores difirieron del virus pariente por 10<sup>2</sup> ó 10<sup>3</sup> veces menos de reacción con anticuerpos monoclonales neutralizantes. Se sugiere que infecciones persistentes e inaparentes de rumiantes, además de ser un reservorio de virus, pueden provocar la selección rápida de variantes antigenicas de aftovirus.

tion of FMDV. In the oesophageal pharyngeal fluid samples, FMDV C<sub>3</sub>-neutralizing activity was present. Antigenic variation was detected with monoclonal antibodies raised against FMDV C<sub>3</sub>. Two isolates from carrier cattle differed from the parental virus by 10<sup>2</sup>- or 10<sup>3</sup>-fold decreased reactivity with neutralizing monoclonal antibodies. It is suggested that persistent, inapparent infections of ruminants, in addition to being a reservoir of virus, may promote the rapid selection of antigenically variant FMDVs.

GIRAUDET, A.T., GOMES, I., AUGÉ DE MELLO, P., BECK, E., TORRE, J.L. La, SCODELLER, E.A., BERGMANN, I.E.

Texto en inglés. J. Virol., 62(10):3789-3794, 1988. Centro Virol. Anim. (CEVAN), Serrano 661, 1414 Cap. Fed., Argentina.

**Comportamiento de recombinantes intertipos entre cepas de aftovirus virulentas y atenuadas en cultivo celular y en bovinos**

Se usaron dos recombinantes intertipos de aftovirus entre la cepa virulenta A Venceslau y mutantes atenuadas resistentes a la guanidina de las cepas C3 Resende u O1 Campos para establecer la región(s) del genoma viral responsable por la atenuación en bovinos. Los recombinantes que heredaron la mitad 3' del genoma de cada pariente atenuado y la mitad 5' de la cepa virulenta fueron seleccionados y examinados para determinar su habilidad de crecimiento en células de bovino y para su virulencia en bovinos. Los resultados concuerdan con un resultado previo, derivado de estudios con recombinantes homotípicos entre aftovirus atenuado de tipo O1 y su cepa virulenta original, que la restricción fenotípica del huésped para las células de riñón de feto bovino de la cepa atenuada es heredada del genoma de la mitad 3'. Para los recombinantes intertipos, sin embargo, esta restricción es aumentada, probablemente por la presencia de una mitad 5' heteróloga de la región genómica. Los resultados *in vitro* concuerdan con los de las pruebas de virulencia en bovinos.

**Behavior of intertypic recombinants between virulent and attenuated aphthovirus strains in tissue culture and cattle**

Two aphthovirus intertypic recombinants between the virulent strain A Venceslau and guanidine-resistant attenuated mutants of either strain C3 Resende or O1 Campos were used to establish the region(s) of the viral genome responsible for attenuation in cattle. Recombinants that inherited the 3' half of the genome from either attenuated parent and the 5' half from the virulent strain were selected and examined for their ability to grow in bovine cells and for virulence in cattle. The results support a previous result, derived from studies with homotypic recombinants between attenuated aphthovirus type O1 and its original virulent strain, that the host range restriction phenotype for fetal bovine kidney cells of the attenuated strain is inherited from the 3' half of the genome. For the intertypic recombinants, however, this restriction is increased, presumably by the presence of a heterologous 5' half of the genomic region. The results *in vitro* correlate with those of virulence tests in cattle.

GRIGUERA, P.R., TISMINETZKY, S.G., LEBENDIKER, M.B., PERILOLO, O.H., TORRE, J.L. La.

Texto en inglés. *Virology*, 165(2):584-588, 1988. Centro Virol. Anim. (CEVAN-CONICET), Serrano 661, 1414 Cap. Fed., Argentina.

**Presencia de un polipéptido 43-kDa en aftoviriones purificados**

Un polipéptido celular 43-kDa (P43) que emigra junto con la actina de la célula huésped por las pruebas SDS-PAGE e isoelectroenfocado en geles está asociado a las partículas 140 S del aftovirus purificadas de células BHK21 marcadas con metionina ( $^{35}\text{S}$ ) antes de la infección. El análisis por ultracentrifugación de los viriones desintegrados demostró que el polipéptido P43 no está asociado a los VP1-3 y contiene subunidades 12 S pero permanece, como el polipéptido viral P4, en la parte alta de los gradientes de sacarosa. Además, la yodinación *in vitro* o el tratamiento con tripsina muestran que el P43 está protegido de la acción de ambos procedimientos y, por lo tanto, apoya la hipótesis de que el polipéptido P43 de la célula huésped está localizado dentro de las partículas virales.

**Presence of a 43-kDa host-cell polypeptide in purified aphthovirions**

A 43kDa cellular polypeptide (P43), which comigrates with host-cell actin in both SDS-PAGE and isoelectrofocusing slab gels, was found associated to 140 S aphthoviral particles purified from BHK 21 cells labeled with ( $^{35}\text{S}$ ) methionine prior to infection. Ultracentrifugation analysis of disrupted virions demonstrates that polypeptide P43 is not associated to VP1-3 containing 12 S subunits but remains, like viral polypeptide VP4, at the top of the sucrose gradients. In addition, *in vitro* iodination or trypsin treatment show that P43 is protected from the action of both procedures and therefore supports the hypothesis that host-cell polypeptide P43 is located within the viral particles.

LIEBERMANN, H., THALMANN, G., NÖCKLER, A., FELFE, P.

Texto en alemán. *Arch. Exper. Vet.*, 42(4): 528-536, 1988. In: *Vet. Bull.*, 59(4):2107, 1989. Insel Riems, DDR-2201, German Democratic Republic.

**Correlaciones entre la dosis de antígeno 146S y el título de anticuerpos en bovinos y porcinos vacunados contra la fiebre aftosa**

Durante el registro oficial de las series de vacuna monovalentes O<sub>1</sub>-Lausanne, A<sub>5</sub>-Riems y C<sub>1</sub>-Teterow, se establecieron las correlaciones entre el nivel del antígeno 146S en una dosis y el título de anticuerpo de bovinos 14 días después de la vacunación, así como la masa viral mínima necesaria para el registro oficial y aceptación de la vacuna. Las pruebas también fueron aplicadas a las vacunas de emulsión oleosa con adyuvante de hidróxido de aluminio. Se establecieron las correlaciones y las dosis mínimas de antígeno preliminares por la prueba de neutralización en placas, también en cerdos.

**Correlations between 146S antigen dose and antibody titre in cattle and pigs vaccinated against foot and mouth disease**

During state registration of monovalent O<sub>1</sub>-Lausanne, A<sub>5</sub>-Riems, and C<sub>1</sub>-Teterow production vaccine batches, correlations between the 146S antigen level in one dose and the antibody titre of cattle 14 days after vaccination were established as was the minimum virus mass required for state registration and acceptance of the vaccine. Tests were also applied to oil emulsion vaccines with aluminium hydroxide adjuvant, and correlations as well as preliminary minimum antigen doses were established by the plaque neutralization test, also in pigs.

LLOYD, R.E., GRUBMAN, M.J., EHRENFELD, E.

Texto en inglés. *J. Virol.*, 62(11):4216-4223, 1988. Dep. Cell, Viral and Molec. Biol., Biochem., Univ. of Utah School of Medicine, Salt Lake City, Utah 84132, y USDA, ARS, Plum Island Animal Disease Center, P.O.Box 848, Greenport, NY 11944, USA.

**Relación del corte del p200 durante la infección con virus picorna con la 2A proteinasa de secuencia**

La infección de células HeLa con poliovirus inhibe de forma abrupta la síntesis de la proteína de la célula huésped. Se piensa que el mecanismo de esta inhibición involucra el corte proteolítico del componente p220 del complejo proteico de unión de la cobertura, y de esa forma causa inactivación funcional del complejo proteico de unión de la cobertura y previene mARNs cubiertos de unir ribosomas. Los datos actuales sugieren que la proteinasa 2A indirectamente produce el corte del p220 por alteración o inactivación de una segunda proteinasa de origen celular. Actualmente hemos evidenciado que la translación de las secuencias de la proteinasa 2A del poliovirus *in vitro* activa el corte del p220. También hemos publicado sobre las secuencias del aminoácido 2A del picornavirus para homología máxima, y mostramos que los picornavirus pueden ser divididos en dos clases, basados en la presencia o ausencia de una secuencia altamente conservada de 18 aminoácidos en la porción terminal carboxi del 2A. Esta secuencia conservada de 2A es homóloga con el sitio activo de la proteinasa cisteína 3C común a todos los picornavirus. Demostramos que los picornavirus que contienen el sitio supuesto de la secuencia activa 2A (esto es, enterovirus y rinovirus) inducirán el corte del p220 *in vivo*. Al contrario, demostramos que dos cardiovirus (virus de encefalomielitis y virus de encefalomiocarditis Theiler) no codifican la secuencia supuesta de proteinasa en la región 2A y no provocan el corte del p220 *in vivo*. La secuencia 2A del aftovirus representa una anulación aparente y consiste de solo 16 aminoácidos, la mayoría de los cuales homólogos con el terminal carboxi de la secuencia 2A del cardiovirus. No contiene el sitio supuesto de la cisteína proteinasa. Sin embargo, la infección por aftovirus provoca el corte completo del p220 de las células BK, y la translación *in vitro* del ARN del aftovirus produce una

**Relationship of p220 cleavage during picorna-virus infection to 2A proteinase sequencing**

Infection of HeLa cells by poliovirus results in an abrupt inhibition of host cell protein synthesis. It is thought that the mechanism of this inhibition involves proteolytic cleavage of the p220 component of the cap-binding protein complex, thereby causing functional inactivation of the cap-binding protein complex and preventing capped (cellular) mRNAs from binding ribosomes. Current data suggest that the viral proteinase 2A indirectly induces p220 cleavage via alteration or activation of a second proteinase of cellular origin. We present evidence that translation of poliovirus proteinase 2A sequences *in vitro* activates p220 cleavage. We have also aligned published picornavirus 2A amino acid sequences for maximum homology, and we show that the picornaviruses can be divided into two classes based on the presence or absence of a highly conserved 18-amino acid sequence in the carboxy-terminal portion of 2A. This conserved 2A sequence is homologous with the active site of the cysteine proteinase 3C common to all picornaviruses. We show that picornaviruses which contain the putative 2A active site sequence (e.g., enteroviruses and rhinoviruses) will induce cleavage of p220 *in vivo*. Conversely, we show that two cardioviruses (encephalomyocarditis virus and Theiler's encephalomyelitis virus) do not encode this putative proteinase sequence in the 2A region and do not induce cleavage of p220 *in vivo*. The foot-and-mouth disease virus (FMDV) 2A sequence represents an apparent deletion and consists of only 16 amino acids, most homologous with the carboxy terminus of the cardiovirus 2A sequence. It does not contain the putative cysteine proteinase active site. However, FMDV infection induces complete cleavage of BK cell p220, and translation of FMDV RNA *in vitro* induces and activity that cleaves HeLa cell p220. The data predict that

actividad que corta el p220 de las células HeLa. Los datos predicen que una proteasa viral alternativa del aftovirus es responsable por provocar el corte del p220.

MATEU, M.G., SILVA, J.L. da, ROCHA, E., BRUM, D.L. de, ALONSO, A., ENJUANES, L., DOMINGO, E., BARAHONA, H.

Texto en inglés. *Virology*, 167(1):113-124, 1988. Centro Biol. Mol., Univ. Autónoma, Canto Blanco, 28049 Madrid, España.

**Heterogenicidad antigenica extensa del aftovirus serotipo C**

La antigenicidad de 46 aislados de campo de aftovirus del serotipo C fue examinada usando 24 anticuerpos monoclonales (MAbs) preparados contra los aftovirus C<sub>1</sub> o C<sub>3</sub> Indiaia. Las reacciones fueron estudiadas por inmunodot, blot inmuno-transferencia y neutralización de la infecciosidad. Los epítopes reconocidos por los 10 MAbs no neutralizantes son conservados en todos los aislados analizados. Al contrario, se ha informado una extrema heterogenicidad antigenica con referencia a la reacción con 14 MAbs que, en esta base, definen por lo menos 12 epítopes involucrados en la neutralización del aftovirus del serotipo C. Los 31 aislados de América del Sur fueron divididos en 17 grupos antigenicos bien definidos y los 15 aislados de Europa en 7 grupos. No hubo correspondencia entre la composición antigenica y el origen —lugar y fecha de aislamiento— de los virus en varias ocasiones. Se muestra heterogenicidad antigenica entre los aftovirus íntimamente relacionados epidemiológicamente. En la mayoría —pero no en todos— de los casos examinados, se encontró una buena correlación entre la unión de un MAb neutralizante a viriones y su habilidad para neutralizar la infecciosidad. Se concluye que la variación de epítopes involucrados en la neutralización del aftovirus es amplia entre los subtipos del serotipo C y también entre los aislados individuales de un subtipo.

MEBUS, C.A., SINGH, E.L.

Texto en inglés. *Proc. of the U.S. Anim. Hlth Assoc.*, 92:183-185, 1988. Agric. Serv., Plum Island Anim. Dis. Center, P.O.Box 848, Greenport, NY 11944, USA.

**Ausencia de transmisión de la fiebre aftosa por transferencia de embriones bovinos**

Se recolectaron embriones y/o óvulos sin fertilizar de 30 vacas superovuladas que habían sido

an alternate FMDV viral protease is responsible for the induction of p220 cleavage.

**Extensive antigenic heterogeneity of foot-and-mouth disease virus of serotype C**

The antigenic behaviour of 46 field isolates of foot-and-mouth disease virus (FMDV) of serotype C has been studied with a panel of 24 monoclonal antibodies (MAbs) prepared against FMDV C<sub>1</sub> or FMDV C<sub>3</sub> Indiaia. Reactivities were assayed by immunodot, immunoelectrotransfer blot, and neutralization of infectivity. The epitopes recognized by the 10 nonneutralizing MAbs are conserved in all isolates analyzed. In contrast, extreme antigenic heterogeneity is documented with regard to reactivity with 14 MAbs that, on this basis, define at least 12 epitopes involved in neutralization of FMDV of serotype C. The 31 isolates from South America were divided into 17 distinct antigenic groups and the 15 isolates from Europe into 7 groups. Lack of correspondence between antigenic composition and the origin —date and place of isolation— of the viruses was noted in several instances. Antigenic heterogeneity is shown among epidemiologically closely related FMDVs. In most—but not all—cases tested, a good correlation was found between binding of a neutralization MAb to virions and its ability to neutralize infectivity. It is concluded that variation of epitopes involved in neutralization of FMDV is extensive among subtypes of serotype C and also among individual isolates of one subtype.

**Failure to transmit foot-and-mouth disease via bovine embryo transfer**

Embryos and/or unfertilized ova were collected from 30 superovulated cows that had been inocu-

inoculadas por vía intravenosa con aftovirus, aproximadamente 22 horas antes del sacrificio. Durante el sacrificio, 28 vacas estaban virémicas. El aftovirus fue aislado del fluido de embriones recolectados de 8 vacas donantes, incluyendo uno de vacas no virémicas. 149 embriones lavados con zona pelúcida intacta fueron implantados en 111 vacas susceptibles y 194 embriones lavados rechazados y/o óvulos sin fertilizar fueron sonicados e inyectados por vía intradermolingual en novillos. Todos los novillos y las vacas receptoras permanecieron serológicamente negativos para anticuerpos de aftovirus. Quince terneros nacidos de las vacas implantadas fueron serológicamente negativos a la fiebre aftosa, el día del nacimiento y a los 30 días de edad. Se sugiere que la tasa pobre de concepción puede haber ocurrido debido a que los embriones obtenidos eran de donantes febres.

lated intravenously with foot and mouth disease (FMD) virus approximately 22 hours before slaughter. At the time of slaughter, 28 cows were viraemic. FMD virus was isolated from embryo collection fluid from 8 donor cows including one of the non-viraemic cows. 149 washed zona pellicula intact embryos were implanted in 111 FMD susceptible recipients and 194 washed rejected embryos and/or unfertilized ova were sonicated and injected intradermal-lingually into steers. All of the steers and recipient cows remained serologically negative for FMD virus antibody. Fifteen calves born to the implanted cows were FMD serologically negative at birth and when 30 days old. It is suggested that the poor conception rate may have been because the embryos were obtained from febrile donors.

PFAFF, E., THIEL, H.J., BECK, E., STROHMAIER, K., SCHALLER, H.

Texto en inglés. *J. Virol.*, 62(6):2033-2040, 1988. Microbiol. Zentrum Mol. Biol., Univ., 6900 Heidelberg, German Federal Republic.

#### Análisis de epítopes neutralizantes sobre aftovirus

Para la investigación de la estructura del determinante antigenico del aftovirus se caracterizaron anticuerpos monoclonales neutralizantes (MAbs) contra el virus completo por Western blot (inmuno blot), inmunoensayo enzimático y experimentos de competición con un péptido sintético, aislado de la proteína estructural VP1, y partículas virales como antígenos. Dos de los cuatro MAbs reaccionaron con cada uno de estos antígenos, mientras que los otros dos MAbs reconocieron solo partículas virales completas y reaccionaron pobremente con el péptido. Los cuatro MAbs mostraron diferentes modelos de neutralización con un panel de 11 cepas de aftovirus diferentes. Las secuencias de proteínas VP1 derivadas de ADNc de las cepas fueron comparadas para encontrar correlaciones entre la estructura primaria de la proteína y la habilidad del virus de ser neutralizado. Los primeros dos MAbs reconocieron epítopes secuenciales superpuestos en el sitio antigenico representado por el péptido, mientras que los otros dos MAbs reconocieron epítopes conformacionales. Estas conclusiones fueron apoyadas y extendidas por los análisis

#### Analysis of neutralizing epitopes on foot-and-mouth disease virus

For the investigation of the antigenic determinant structure of foot-and-mouth disease virus (FMDV), neutralizing monoclonal antibodies (MAbs) against complete virus were characterized by Western blot (immunoblot), enzyme immunoassay, and competition experiments with a synthetic peptide, isolated coat protein VP1, and viral particles as antigens. Two of the four MAbs reacted with each of these antigens, while the other two MAbs recognized only complete viral particles and reacted only very poorly with the peptide. The four MAbs showed different neutralization patterns with a panel of 11 different FMDV strains. cDNA-derived VP1 protein sequences of the different strains were compared to find correlations between the primary structure of the protein and the ability of virus to be neutralized. Based on this analysis, it appears that the first two MAbs recognized overlapping sequential epitopes in the known antigenic site represented by the peptide, whereas the two other MAbs recognized conformational epitopes. These conclusions were supported and extended by structural

sis de la estructura de las mutantes de aftovirus resistentes a la neutralización por un MAb específico para el epítopo conformacional. Estos resultados muestran que no ocurrieron cambios del aminoácido en el sitio antigenico primario del VP1 pero sí en las otras proteínas estructurales VP2 y VP3, que por sí mismas no producen anticuerpos neutralizantes.

**ROSSI, M.S., SADIR, A.M., SCHUDEL, A.A., PALMA, E.L.**

Texto en inglés. *Arch. Virol.*, 99(1/2):67-74, 1988. Instituto de Virología, Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, INTA, Casilla de Correo 77, 1708 Morón, Prov. de Buenos Aires, Argentina.

**Detección de aftovirus con sondas de ADN en líquidos esofágico-faríngeos de bovinos**

Se compararon las técnicas de infecciosidad e hibridización dotblot para la detección de aftovirus en líquidos esofágico-faríngeos (LEF) de vacas infectadas experimentalmente. La sonda usada incluye la secuencia de la polimerasa viral que permite revelar los tres tipos de virus (A, O y C) con sensibilidad equivalente. El virus fue detectado por hibridización dotblot así como por infecciosidad, de acuerdo con el análisis de la muestra de LEF extraída a los siete días posinfección. No fue posible recuperar virus infeccioso de algunas muestras extraídas a los 180 y 560 días posinfección, aunque el ARN viral específico fue detectado por hibridización dotblot. Esto indicaría la presencia de una alta tasa de mutantes virales no infecciosas en bovinos portadores de aftovirus. Estos resultados enfatizan la utilidad de las técnicas de hibridización molecular para investigar el estado de portador de aftovirus.

**SADIR, A.M., SCHUDEL, A.A., LAPORTE, O., BRAUN, M., MARGNI, R.A.**

Texto en inglés. *Epid. Infect.*, 100(1):135-144, 1988. Departamento de Virología, Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, INTA, Casilla de Correo 77, 1708 Morón, Prov. de Buenos Aires, Argentina.

**Respuesta de vacunas antiaftosa en terneros recién nacidos. Influencia de la edad, anticuerpos colostrales y adyuvantes**

Se prepararon vacunas oleosas y acuosas con la misma partida del aftovirus inactivado A<sub>24</sub> 8345. Los terneros nacidos de vacas vacunadas, a los 30 ó 90 días post-parto no respondieron a la vacuna acuosa. Cuando se usó la vacuna oleosa en un grupo similar de terneros, no aparecieron respuestas

analyses of FMDV mutants resistant to neutralization by an MAb specific for a conformational epitope. These results demonstrate that no amino acid exchanges had occurred in the primary antigenic site of VP1 but instead in the other coat proteins VP2 and VP3, which by themselves do not induce neutralizing antibodies.

**ROSSI, M.S., SADIR, A.M., SCHUDEL, A.A., PALMA, E.L.**

Texto en inglés. *Arch. Virol.*, 99(1/2):67-74, 1988. Instituto de Virología, Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, INTA, Casilla de Correo 77, 1708 Morón, Prov. de Buenos Aires, Argentina.

**Detection of foot-and-mouth disease virus with DNA probes in bovine esophageal-pharyngeal fluids**

Infectivity and dot-blot hybridization techniques were compared for the detection of FMDV in esophageal-pharyngeal fluid from experimentally infected cows. The probe used includes the viral polymerase sequence which allows the detection of the three types of virus (A, O and C) with equivalent sensitivity. Virus was detected by dot-blot hybridization as well as by infectivity, according to sample analysis of esophageal-pharyngeal fluids extracted seven days post-infection. It was not possible to recover infective virus from some samples extracted at 180 and 560 days post-infection, although specific viral RNA was detected by dot-blot hybridization. This could indicate the presence of a high ratio of non-infective viral mutants in FMDV carrier cattle. These results emphasize the usefulness of molecular hybridization techniques for FMDV carrier-state detection.

**Response to foot-and-mouth disease vaccines in newborn calves. Influence of age, colostral antibodies and adjuvants**

Oil-emulsified (OE) and aqueous (Aq) vaccines were prepared with the same batch of inactivated A<sub>24</sub> 8345 foot and mouth disease virus (FMDV). Calves born to vaccinated dams did not respond to the Aq vaccine 30 or 90 days post partum. When the OE vaccine was used on a similar group of

hasta los 21 días post-parto. Sin embargo, los terneros de 30 o más días de edad, con la vacuna oleosa tuvieron una respuesta similar a los bovinos adultos. Cuando se usó vacuna oleosa en terneros de 3-30 días de edad libres de anticuerpos calostrales, todos los animales mostraron buenas respuestas de anticuerpos, pero en terneros vacunados a los 3 ó 7 días post-parto, solo se detectaron anticuerpos después de un período de tiempo considerable. Los resultados muestran que la adquisición pasiva de anticuerpos calostrales y la edad son importantes en la respuesta de terneros muy jóvenes a la vacuna antiaftosa oleosa. Desde un punto de vista práctico, en las áreas endémicas donde los bovinos adultos son periódicamente vacunados, la vacunación de terneros entre 30 y 60 días post-parto con vacunas oleosas podría llevar a niveles elevados de protección del rebaño.

calves, no responses were elicited up to 21 days post partum. However, calves 30 or more days old responded like adult cattle to the OE vaccine. When the OE vaccine was used in colostral antibody-free calves 3-30 days old, all animals showed good antibody responses but, in calves vaccinated 3 or 7 days post partum, antibodies were detectable only after a considerable period of time. Our results show that both passively acquired colostral antibodies and age are important in the response of very young calves to FMDV oil vaccines. From a practical point of view, in endemic areas where adult cattle are periodically vaccinated, vaccination of calves between 30 and 60 days post partum with OE vaccines would lead to high levels of herd protection.

SAMARA, S.I., PINTO, A.A., ABUHAD, T.G., KOSEKI, I., GONÇALVES, E.I., MANO FILHO, A.C.

Texto en inglés. Rev. Fac. Med. Vet. Zootec., Univ. S.Paulo, 24(1):35-40, 1987. In: FMD Bull., 27(3): 89/61, 1989. Faculdade de Ciencias Agrarias e Veterinarias de Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

**Persistencia de anticuerpos calostrales contra el antígeno VIA y anticuerpos neutralizantes producidos por infección natural con aftovirus en terneros (*Bubalus bubalis*) de India**

Fueron estudiados anticuerpos contra el antígeno VIA y anticuerpos seroneutralizantes del aftovirus en 32 terneros de búfalos de India sin vacunar. Los niveles de anticuerpos del antígeno VIA fueron encontrados por inmunodifusión doble en 76,6%, 30% y 6,2% de los animales a los 3,5, 4,5 y 5,5 meses edad, respectivamente. Anticuerpo contra el antígeno VIA no fue más detectado a los 7,5, 8,5 y 9,5 meses de edad. Se estudiaron los niveles de anticuerpos seroneutralizantes en 12 de los 32 animales, a los 3,5 meses de edad, los anticuerpos seroneutralizantes para los virus O<sub>1</sub>, A<sub>24</sub> y C<sub>3</sub> fueron encontrados en 83,3%, 83,3% y 65,5% de las muestras, respectivamente. A los 5,5 meses de edad los anticuerpos seroneutralizantes se encontraron contra los tres tipos solo en 20% de los animales y no se detectaron a los 7,5 meses de edad. A los 21 días después de un brote en bovinos, cuando los terneros de búfalo tenían

**Persistence of colostral antibodies against virus-infection-associated (VIA) antigen and virus neutralizing antibodies induced by natural infection with foot-and-mouth disease virus in Indian (*Bubalus bubalis*) calves**

Antibody against virus-infection-associated (VIA) antigen and neutralizing serum antibody to foot-and-mouth disease virus were studied in 32 non vaccinated Indian buffalo calves. Antibody levels against VIA antigen were detected by double immunodiffusion in 76.6% of the animals at 3.5, 30% at 4.5 and 6.2% at 5.5 months of age. Antibody against VIA antigen was no longer detectable at 7.5, 8.5 and 9.5 months of age. Neutralizing serum antibody levels were studied in 12 of 32 animals. At 3.5 months of age neutralizing serum antibody for O<sub>1</sub>, A<sub>24</sub> and C<sub>3</sub> virus were found respectively in 83.3%, 83.3% and 65.6% of samples. At 5.5 months of age neutralizing serum antibody was present against the three types only in 20% of the animals and was not detected at 7.5 months of age. Twenty one days after the outbreak in cattle when the buffalo calves were 12.5 months old antibody against VIA antigen was

12,5 meses de edad, se encontró nuevamente anticuerpos contra el antígeno VIA en 20 de los 32 (62,5%) animales. Los anticuerpos seroneutralizantes fueron encontrados en 63,3% de los animales contra el tipo A y 16,6% contra los tipos O<sub>1</sub> y C<sub>3</sub>.

STAVE, J.W., CARD, J.L., MORGAN, D.O., VAKHARIA, V.N.

Texto en inglés. *Virology*, 162(1):21-29, 1988. USDA, Plum Island Animal Disease Center, P.O.Box 848, Greenport, NY 11944, USA.

**Sitios de neutralización del aftovirus tipo O1 definidos por anticuerpos monoclonales y por variantes resistentes a la neutralización por monoclonales**

Se obtuvieron anticuerpos monoclonales (MAbs) de ratones infectados con aftovirus tipo O1 Brugge (O1B) o inmunizados con viriones inactivados (140 S), o subunidades virales (12 S). Se caracterizó un total de 19 MAbs neutralizantes de los cuales 17 reconocieron epítopes de aminoácidos en el VP1 aislado. Los MAbs neutralizantes fueron usados para seleccionar variantes antigenicas de aftovirus O1B. Basados en neutralización cruzada y pruebas de unión con MAbs, las variantes fueron divididas en grupos discretos demostrando la presencia de tres sitios únicos de neutralización en el aftovirus O1B. Un sitio estaba presente solo en los viriones intactos 140 S, un segundo estaba presente en los viriones 140 S y en las subunidades 12 S, y un tercer sitio estaba presente en los viriones 140 S, en las subunidades 12 S y en el VP1 aislado. La comparación de la secuencia de ácido nucleico deducido del aftovirus O1B con el de las variantes de O1B demostró que el epítope reconocido por el reaccionante VP1, MAbs-neutralizante, incluyó los residuos de los aminoácidos 138, 144 y 148. Pruebas de neutralización cruzada demostraron que estos tres sitios de neutralización del aftovirus O1B funcionan en otras cepas del tipo O1 del aftovirus.

WESTBURY, H.A., DOUGHTY, W.J., FORMAN, A.J., TANGCHAITRONG, S., KONGTHON, A.

Texto en inglés. *Vet. Microbiol.*, 17(1):21-28, 1988. CSIRO, Anim. Hlth Lab., P.O.Bag 24, Geelong, Vic. 3220, Australia.

**Comparación de las pruebas de ELISA, fijación del complemento y el aislamiento de virus para el diagnóstico de la fiebre aftosa**

Se examinó un total de 205 muestras de tejido epitelial, para la presencia de aftovirus, por las

against detected in 20 of 32 (62.5%) of the animals. Neutralizing serum antibody was found in up to 63.3% of animals against type A and 16.6% against types O<sub>1</sub> and C<sub>3</sub>.

**Neutralization sites of type O1 foot-and-mouth disease virus defined by monoclonal antibodies and neutralization-escape virus variants**

Monoclonal antibodies (MAbs) were derived from mice infected with foot-and-mouth disease virus type O1 Brugge (FMD O1B) or immunized with inactivated virions (140 S) or viral subunits (12 S). A total of 19 neutralizing MAbs were characterized of which 17 recognized conformationally determined epitopes and two recognized amino acid sequences on isolated VP1. Neutralizing MAbs were used to select antigenic variants of FMDV O1B. Based on cross-neutralization and binding assays with MAbs the variants were divided into discrete groups demonstrating the presence of three unique neutralization sites on FMDV O1B. One site was present only on intact 140 S virions, a second was present on both 140 S virions and 12 S subunits, and the third was present on 140 S virions, 12 S subunits, and isolated VP1. Comparison of the deduced nucleic acid sequence of parental FMDV O1B with those of the O1B variants demonstrated that the epitope recognized by the VP1-reactive, neutralizing MAbs included amino acid residues 138, 144 and 148. Cross-neutralization assays demonstrated that these three neutralization sites of FMDV O1B function on other type O1 strains of FMDV.

**A comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, complement fixation and virus isolation for foot and mouth disease diagnosis**

A total of 205 epithelial tissue samples were examined for the presence of foot and mouth

pruebas de fijación del complemento (FC), ELISA y/o aislamiento de virus en tiroide de bovino o cultivo de células de riñón. El virus fue aislado en 134 (67%) de 201 de las muestras, y se las denominó muestras de virus positivas. La prueba de FC detectó antígeno viral en 30 (24%) de las 123 muestras de virus positivas, mientras que por la prueba de ELISA se detectó 100 (81%) de estas muestras. La prueba de ELISA fue por lo menos tres veces más eficiente que la prueba de FC en comprobar el virus en muestras de tejido epitelial. Hubo cinco muestras de las cuales el virus no fue aislado pero que fueron positivas por la prueba de ELISA. Esta prueba fue especialmente ventajosa para examinar las muestras de cerdos y para evaluar muestras de animales con lesiones curadas. La prueba de ELISA dio resultados del tipo de virus específicos en 89% de los 63 casos de virus positivo, comparado con los 40% que dio la prueba de FC. Por lo tanto, la prueba de ELISA fue un método muy útil, preciso y sensible para pruebas directas de tejidos epiteliales de animales afectados.

disease virus by either the complement-fixation (CF) test, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and/or by virus isolation in bovine thyroid or kidney cell cultures. The virus was isolated from 134 of the 201 (67%) specimens. Samples, from which virus was isolated, were termed virus positive samples. The CF test detected viral antigen in 30 (24%) of 123 virus-positive samples, whereas the ELISA detected it in the 100 (81%) of these specimens. The ELISA was thus at least 3 times more efficient than the CF test in detecting the virus in epithelial-tissue samples. There were 5 samples from which virus was not isolated but which were positive with the ELISA procedure. The ELISA was particularly useful for testing samples from pigs and for assessing specimens from animals with resolving lesions. The ELISA gave virus type-specific results in 89% of 63 virus-positive cases compared to 40% for the CF test. The ELISA was thus a very useful, accurate and sensitive method for the direct testing of epithelial tissues of affected animals.

**BIBLIOGRAFIA SOBRE ENFERMEDADES VESICULARES****VESICULAR DISEASES BIBLIOGRAPHY**

- ANTONI, F., SOÓS, T., VARGA, J., MÉCS, I., PENKE, B., HORVÁTH, K., BOGNÁR, K., TUBOLY, S.  
(Eficacia de vacunas antiaftosa experimentales de péptido sintético. Efficacy of experimental synthetic peptide vaccines against foot and mouth disease.) Texto en húngaro. *Magyar Allatorvosok Lapja*, 43(9):561-566, 1988. In: *Vet. Bull.*, 59(5):2688, 1989. Puskin u.9, 1088 Budapest, Hungary.
- ARZUAGA, E.A., LARRIERA, G.M.  
Tratamiento de lesiones de fiebre aftosa con propolis. (Treatment of foot and mouth disease lesions with Propolis.) *Vet. Argentina*, 5(49):767-770, 1988. In: *Virol. & Aids Abst.*, 22(7):5223-V22, 1989. Lab. Fiebre Aftosa, SENASA, Argentina.
- BAHARAV, D.  
(Manejo de la gacela de las montañas en el norte de Israel con relación al control de la enfermedad silvestre.) Mountain gazelle management in northern Israel in relation to wildlife disease control. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 7:925-927, 1988. Nature Reserves Authority, Jerusalem and Department of Town and Regional Planning Technion, Haifa, Israel.
- BELSHAM, G.J., BOSTOCK, C.J.  
(Estudios sobre la infecciosidad del ARN del aftovirus usando microinyección.) Studies on the infectivity of foot-and-mouth disease RNA using microinjection. *J. gen. Virol.*, 69(2):265-274, 1988. AFRC Inst. Anim. Hlth, Ash Road, Pirbright, Woking Surrey GU24 0NF, UK.
- BENGIS, R.G., ERASMUS, J.M.  
(Enfermedad silvestre en África del Sur: una revisión.) Wildlife disease in South Africa: a review. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 7:807-821, 1988.
- BLACK, L., FRANCIS, M.J.  
(Alergenos potenciales en vacunas antiaftosa de emulsión oleosa para cerdos.) Potential allergens in oil emulsion foot-and-mouth disease vaccines for pigs. *Epid. Infect.*, 101(2):477-480, 1988. Hamshire Cottage, The Street, Wonersh, Surrey GU5 0PF, UK.
- BLACKWELL, J.H., NOLAN, E.J., RICKANSURD, D.A.  
(Energía calórica total de un proceso térmico como índice de letalidad para el aftovirus.) Total calorific input of a thermal process as an index of lethality for foot-and-mouth disease virus. *J. Food Science*, 53(1):185-190, 1988. In: *Vet. Bull.*, 58(6):3372, 1988. Foreign Anim. Dis. Diagnostic Lab., APHIS, USDA, Greenport, NY 11944, USA.
- BOIKO, A.A., KRUGLIKOV, B.A.  
(Relaciones entre cepas heterogéneas del aftovirus. Relationships between heterogeneous strains of aphthovirus.) Texto en ruso. *Veterinariya*, Moscow, USSR, 3:33-35, 1988. In: *Vet. Bull.*, 58(7):4103, 1988. Vsesoyuznyi Institut Biologich. Promyshlennosti, Moscow, USSR.

BÖLÜKBASI, F., YILMAZ, B., EMRE, B., SULU, N., OZTÜRK MEN, A.

(Algunos estudios fisiológicos en cobayos y bovinos infectados con aftovirus. II. Electrocardiograffa. Some physiological studies in guinea pigs and cattle infected with foot and mouth disease virus. II. Electrocardiography.) Texto en turco. *Veteriner Fakültesi Dergisi, Ankara Universitesi*, 34(2):349-362, 1987. In: *Vet. Bull.*, 59(11):6371, 1989. Vet. Fak., Univ., Ankara, Turkey.

BROOKSBY, J.B.

(El virus de la fiebre aftosa.) Foot-and-mouth disease virus. In: *Portraits of viruses. A history of virology*. Ed. F.Fenner, A.Gibbs. Basel, Switzerland, Ed. S.Karger, 1988. p.124-146. In: *Virol. & Aids Abst.*, 22(2):1205-V22, 1988. Heatherdale House, 5 Compton Way, Farnham, Surrey GU10 1QY, UK.

BUTCHAIAH, G., RAO, B.U.

(Congelamiento y secamiento de aftovirus y su aplicación en la producción de vacunas de virus inactivado.) Freeze-drying of foot and mouth disease virus and its application in inactivated virus vaccine production. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 7(2):347-356, 1988. Vet. Res. Inst., Hebbal, Bangalore 560 024, India.

CLARKE, B.E., SANGAR, D.V.

(Procesamiento y montaje de proteínas de aftovirus usando ARN subgenómico.) Processing and assembly of foot-and-mouth disease virus proteins using subgenomic RNA. *J. gen. Virol.*, 69(9):2313-2325, 1988. Dep. Virol., Wellcome Biotech. Lab., Langley Court, Beckenham, Kent BR3 3BS, UK.

CLERCO, K. de, STROBBE, R., DEBECQ, J.

(Vacunación antiaftosa en Bélgica: una encuesta serológica.) Foot-and-mouth disease vaccination in Belgium: a serologic survey. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 57(2):105-108, 1988. In: *Vet. Bull.*, 58(9):5281, 1988. Nat. Inst. Vet. Res., Groeselenberg 99, B-1180, Ukkel, Belgium.

COX, J.H., YOUNG, D.B., LAMB, J.R. et al.

(La orientación de los epítopes influencia la inmunogenicidad de los dímeros del péptido sintético.) Orientation of epitopes influences the immunogenicity of synthetic peptide dimers. *Eur. J. Immunol.*, 18:2015-2019, 1988. In: *FMD Bull.*, 27(2):89/24, 1989. MRC Tuberculosis and Related Infections Unit, Royal Postgraduate Medical School, Hammersmith Hospital, London and Department of Virology, Wellcome Biotechnology Ltd., Beckenham, UK.

DAVIES, G.

(Un análisis económico de opciones políticas contra la fiebre aftosa – problemas y oportunidades). An economic analysis of foot and mouth disease policy options – problems and opportunities. *Acta Veterinaria Scandinavica*, Suppl. 84:423-426, 1988. MAFF, Hook Rise South, Tolworth, Subiton, Surrey KT6 7NF, UK.

DONALDSON, A.I.

(Investigaciones para determinar las dosis mínimas de aerosol de aftovirus para infectar ovinos y bovinos.) Investigations to determine the minimum aerosol doses of foot-and-mouth disease virus to infect sheep and cattle. In: *Aerosols. Their generation, behaviour and applications. First Conference*, Loughborough University of Technology, 31 March-1 April 1987. Aerosol Society, 1987. p.121-123. In: *Vet. Bull.*, 59(2):839, 1989. Inst. Anim. Dis. Res., Pirbright, Woking, Surrey GU23 0NF, UK.

DONALDSON, A.I., GIBSON, C.F., OLIVER, R., HAMBLIN, C., KITCHING, R.P.

(Infección de bovinos por aftovirus a través del aire: dosis mínimas con las cepas O<sub>1</sub> y SAT-2.)  
Infection of cattle by airborne foot-and-mouth disease virus: minimal doses with O<sub>1</sub> and SAT2 strains.  
Res. Vet. Sci., 43(3):339-346, 1987. Anim. Virus Res. Inst., Pirbright, Woking, Surrey GU24 0NF, UK.

DUJIN, T., PANJEVIĆ, D., POPOVIĆ, M., VALCIĆ, M., GALIĆ, M., CIRKOVIĆ, D.

(Inmunoprofilaxis de porcinos contra la fiebre aftosa. I. II. Immunoprophylaxis of swine against foot and mouth disease. I. II.) Texto en serbio-croata. Veterinarski Glasnik, 41(10):799-803, 805-809, 1987. In: Vet. Bull., 58(11):6852, 1988. Vet. Inst., Novi Sad, Yugoslavia.

DUJIN, T., PANJEVIĆ, D., POPOVIĆ, M., VALCIĆ, M., CIRKOVIĆ, D.

(Inmunoprofilaxis de la fiebre aftosa en cerdos. III. Foot and mouth disease immunoprophylaxis in pigs. III.) Texto en serbio-croata. Veterinarski Glasnik, 42(11-12):725-728, 1988. In: Vet. Bull., 59(11):6373, 1989. Vet. Inst., Novi Sad, Yugoslavia.

ESTERHUYSEN, J.J., THOMSON, G.R., ASHFORD, W.A., LENTZ, D.W., GAINARU, M.D., SAYER, A.J., MEREDITH, C.D., RENSBERG, D.J. van, PINI, A.

(La conveniencia de usar un sistema de monocamada de células BHK<sub>21</sub> en roller para la producción de vacunas antiaftosa de virus tipos SAT. I. Adaptación de aislados de virus al sistema, cantidad de inmunógeno alcanzada y magnitud de la reacción cruzada del subtipo.) The suitability of a rolled BHK<sub>21</sub> monolayer system for the production of vaccines against the SAT types of foot-and-mouth disease virus. I. Adaptation of virus isolates to the system, immunogen yields achieved and assessment of subtype cross reactivity. Onderstepoort J. Vet. Res., 55(2):77-84, 1988. Vet. Res. Inst., Onderstepoort 0110, South Africa.

FARIAS, S.E., ROSSETTI, M.L., ZAHA, A., SANTOS, D.S.

(Producción y caracterización parcial de anticuerpos monoclonales al aftovirus.) Production and partial characterization of monoclonal antibodies to foot-and-mouth disease virus. Arq. Biol. Tecnol., 31(1):47, 1988. Abstract. In: Index Vet., 56(7):8, 1988.

FERRIS, N.P.

(Selección de anticuerpos de fiebre aftosa para el diagnóstico por ELISA.) Selection of foot and mouth disease antisera for diagnosis by ELISA. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 7:331-346, 1988. World Reference Laboratory for Foot and Mouth Disease, Inst. Anim. Dis. Res., Pirbright Lab., Pirbright, Woking, Surrey GU24 0NF, UK.

FERRIS, N.P., DAWSON, M.

(Aplicación de rutina de la prueba de ELISA en comparación con la fijación del complemento para el diagnóstico de la fiebre aftosa y de la enfermedad vesicular del cerdo.) Routine application of enzyme-linked immunosorbent assay in comparison with complement fixation for the diagnosis of foot-and-mouth and swine vesicular diseases. Vet. Microbiol., 16:201-209, 1988. Inst. Anim. Dis. Res., Pirbright, Woking, Surrey GU24 0NF, UK.

FERRIS, N.P., POWELL, H., DONALDSON, A.I.

(Uso de inmunoplacas previamente cubiertas y de reaccionantes congelados y secados para el diagnóstico por ELISA de la fiebre aftosa y la enfermedad vesicular del cerdo.) Use of pre-coated immuno-plates and freeze-dried reagents for the diagnosis of foot-and-mouth disease and swine vesicular

disease by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Virol. Meth.*, 19(3/4):197-206, 1988. Inst. Anim. Hlth, Pirbright, Lab., Ash Road, Pirbright, Woking, Surrey GU24 0NF, UK.

FLACHSEL, P., HUBIK, R.

(Influencia de animales jóvenes en la eficacia de los programas de vacunación contra la fiebre aftosa en bovinos y porcinos.) Influence of young animals on the efficacy of vaccination programmes against FMD in cattle and pigs. *Rep. Sess. Res. Gp. Stand. Tech. Comm. Eur. Comm. Control FMD*, (FAO), Prague, 1988. In: *FMD Bull.*, 27(2):89/31, 1989. Bioveta, Terezin, Czechoslovakia.

GARCIA-CARRILLO, G.

Efecto de la vacuna antiaftosa en adyuvante oleoso aplicada un mes antes o un mes después que la vacuna *B. abortus* cepa 19 sobre la inmunidad contra la brucelosis en cobayos. (Effect of foot and mouth disease vaccine in oil adjuvant given one month before or after strain 19 vaccine on protection against brucellosis in guinea pigs.). Texto en español. *Rev. Med. Vet.*, 68(5):240-244, 1987. In: *Vet. Bull.*, 59(2):834, 1989. Centro Panamericano de Zoonosis, WHO, Casilla Correo 3092, Correo Central, 1000 Buenos Aires, Argentina.

GARCIA-VIDAL, W., BLACKWELL, J.H., CORREA, C.A., HUERTAS, S., URRESTARAZU, V.

(Efectividad virulenta de procesamiento en envoltorios flexibles de productos cárnicos preparados de bovinos afectados por la fiebre aftosa.) Virucidal effectiveness of flexible pouch processing of meat products prepared from foot-and-mouth disease-affected cattle. *J. Food Sci.*, 53(6):1656-1662, 1988. In: *Vet. Bull.*, 59(7):3959, 1989. Foreign Anim. Dis. Diag. Lab., APHIS, USDA, Greenport, New York, USA.

GIACCHETTI, C., CARRILLO, E.C., CAMPOS, R.H.

(Otras características de un mutante de ARN defectivo del aftovirus.) Further characterization of an RNA defective mutant of the foot-and-mouth disease virus. *Virus Res.*, 11(3):257-267, 1988. In: *FMD Bull.*, 27(1):89/13, 1989. Center of Animal Virology, Serrano 661, 1414 Cap. Fed., Argentina.

GUALANDI, G.L.

(Epidemia de fiebre aftosa en porcinos: la situación en Italia. Epidemic of foot and mouth disease in swine:the situation in Italy.) Texto en italiano. *Selez. Vet.*, 29(1 bis):185-188, 1988. Istituto Zooprof. Lombardia, Brescia, Italia.

GUILLEMIN, F., MOSIENYANE, M., RICHARD, T., MANNATHOKO, M.

(Respuesta inmunitaria y desafío de bovinos vacunados simultáneamente contra peste bovina y fiebre aftosa.) Immune response and challenge of cattle vaccinated simultaneously against rinderpest and foot-and-mouth disease. *Rev. Élev. Méd. Vét. Pays Trop.*, 40(3):225-229, 1987. publ. 1988. In: *Vet. Bull.*, 58(8):4782, 1988. Vaccine Inst., Private Bag 0031, Gaborone, Botswana.

HOLL, U., SULK, I.

(Determinación de anticuerpos específicos de fiebre aftosa en muestras de sueros de bovinos vacunados y convalecientes por medio de ELISA. Determination of foot and mouth disease specific antibodies in serum samples of vaccinated and convalescent cattle by means of enzyme immunoassay). Texto en alemán. *Arch. Exper. Vet.*, 42(3):470-476, 1988. In: *Vet. Bull.*, 59(1):150, 1989. VEB Friedrich Loeffler Inst., Insel Riems, DDR-2201 German Democratic Republic.

ILIEVA, D., KARADZHOV, S., TEKERLEKOV, P.

(Acción de algunos desinfectantes sobre el aftovirus. Action of some disinfectants on foot and mouth disease virus.) Texto en búlgaro. *Vet. Sbirka*, 86(4):32-35, 1988. In: *Vet. Bull.*, 59(2):843, 1989. Tsentralen Vet.-Med. Inst., Sofia, Bulgaria.

ILIEVA, D., TEKERLEKOV, P., INVANOV, Ya.

(Dinámicas de inactivación por calor de cepas vacunales de aftovirus. Dynamics of heat inactivation of vaccine strains of aphtovirus.) Texto en búlgaro. *Vet. Sbirka*, 86(8):7-10, 1988. In: *Vet. Bull.*, 59(6):3290, 1989. Tsentralen Vet.-Med. Inst., Sofia, Bulgaria.

KITCHING, R.P., RENDLE, R., FERRIS, N.P.

(Correlación rápida entre aislados de campo y cepas vacunales de aftovirus.) Rapid correlation between field isolates and vaccine strains of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine*, 6(5):403-408, 1988. AFRC Inst. Anim. Hlth, Pirbright, Woking, Surrey GU24 0NF, UK.

KRUGLIKOV, B.A. TARASENKO, T.Ya., SALAZHOV, E.L., SCHCHENEV, A.I., PODGORNYI, I.M., GOLOVINOV, V.A.

(Método económico y confiable para titulación de aftovirus en lechones. Economical and reliable method of titrating aphthovirus in piglets.) Texto en ruso. *Veterinariya*, Moscow, USSR, 8:27-28, 1988. In: *Vet. Bull.*, 58(12):7599, 1988. Vsesoyuznyi Institut Vetpreparatov, Moscow, USSR.

KRUSCHKE, P., THALMANN, G., STREBELOW, G.

(Diferenciación de cepas de aftovirus de tipo O por métodos serológicos y biofísico-químicos. Differentiation of foot and mouth disease virus strains of type O by serological and biophysicochemical methods.) Texto en alemán. *Arch. Exper. Vet.*, 42(2):174-182, 1988. In: *Vet. Bull.*, 59(1):148, 1989. VEB Friedrich Loeffler Inst., Insel Riems, DDR-2201, German Democratic Republic.

LIEBERMANN, H., HANTSCHEL, H.

(Cuantificación comparativa de aftovirus—antígeno 146S—por centrifugación en gradiente de densidad de sucrosa y de bromuro de potasio.) Comparative quantification of foot-and-mouth disease virus (146 S antigen) by sucrose and potassium-bromide density gradient centrifugation. *Arch. Exper. Vet.*, 42(1):65-70, 1988. In: *Vet. Bull.*, 58(11):6857, 1988. VEB Friedrich Loeffler Inst., Insel Riems, DDR-2201, German Democratic Republic.

LIEBERMANN, H., KWASNIEWSKI, W., SPRING, A.

(Determinación cuantitativa directa de aftovirus por un fotómetro de flujo UV tras centrifugación en un gradiente de densidad de sucrosa de bromuro de potasio. Direct quantitative determination of FMD-virus by a UV-flow photometer after centrifugation in a KBr-sucrose density gradient.). Texto en alemán. *Biol. Rundsch.*, 25(1):45-47, 1987. In: *Virol. & Aids Abstr.*, 22(2):1013-V22, 1989. Friedrich Loeffler Inst., Insel Riems, DDR-2201, German Democratic Republic.

LORENZ, R.J.

(Un estudio del costo de eficacia de la vacunación antiaftosa en la República Federal de Alemania). A cost effectiveness study on the vaccination against foot-and-mouth disease (FMD) in the Federal Republic of Germany. *Acta Vet. Scandinavica*, Suppl. 84:427-429, 1988. In: *Vet. Bull.*, 59(7):3955, 1989. Fed. Res. Centre VirusDis. Anim., P.O.Box 1149, D-7400 Tübingen, German Federal Republic.

LUBROCH, J., YEDLOUTSCHING, R.J.

(Estudios de fiebre aftosa en la llama –*Lama glama*–.) Foot-and-mouth disease in the llama (*Lama glama*). **Proceedings United States Animal Health Association**, 91:313-316, 1987. Mexican-US Commission FMD, Calle Hegal 713, Colonia Polanco 11560, México.

LUO, M., ROSSMANN, M.G., PALMENBERG, A.C.

(Predicción de modelos tridimensionales para el aftovirus y el virus de la hepatitis A.) Prediction of three-dimensional models for foot-and-mouth disease virus and hepatitis A virus. **Virology**, 166(2): 503-514, 1988. Dep. Biol. Sci., Purdue Univ., West Lafayette, IN 47907, USA.

MARQUARDT, O., KARL-HEINZ, A.

(Secuencias del cápside de la proteína VP1 de dos tipos A de aftovirus.) Sequences of capsid protein VP1 of two type A foot-and-mouth disease viruses. **Virus Genes**, 2(3):283-291, 1988. In: **FMD Bull.**, 27(3):89/48, 1989. Fed. Res. Centre Virus Dis. Anim., P.O.Box 1149, D-7400 Tübingen, German Federal Republic.

MARTINEZ, M.A., CARRILLO, C., PLANAS, J., MASCARELLA, R., BERGADA, J., PALMA, E.L., DOMINGO, E., SOBRINO, F.

(Variaciones genéticas e inmunogénicas entre aislados de aftovirus íntimamente relacionados.) Genetic and immunogenic variations among closely related isolates of foot-and-mouth disease virus. **Gene**, 62(1):75-84, 1988. In: **FMD Bull.**, 26(2):88/33, 1988. Inst. Nac. Invest. Agrarias, C/Embajadores 68, 28012 Madrid, España.

MASSIRIO, I., BAREI, S., AMADORI, M. *et al.*

(Efecto de anticuerpos maternos en la respuesta humoral tras vacunación contra la fiebre aftosa en terneros.) Effect of maternally-derived antibody on the humoral response to vaccination against foot and mouth disease virus in calves. **Rep. Sess. Res. Gp. Stand. Tech. Comm. Eur. Comm. Control FMD**, (FAO), Prague, 1988. In: **FMD Bull.**, 27(2):89/37, 1989. Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia, Brescia, Italia.

MASSIRIO, I., BOLDINI, M., BRUGUETTI, M. *et al.* JERABEK, J., DRABEK, J., FLACHSEL, P. *et al.* CLERCQ, K. de, KOENEN, F., STROBBE, R. *et al.*

(Vacunación simultánea de cerdos contra la fiebre aftosa y la peste porcina clásica.) Simultaneous vaccination of pigs against FMD and classical swine fever (CSF). 3 trabajos—3 papers. **Rep. Sess. Res. Gp. Stand. Tech. Comm. Eur. Comm. Control FMD**, (FAO), Prague, 1988. In: **FMD Bull.**, 27(2): 89/36, 1989.

McCULLOUGH, K.C., PARKINSON, D., CROWTHER, J.R.

(Fagocitosis del aftovirus acentuada por opsonización). Opsonization-enhanced phagocytosis of foot-and-mouth disease virus. **Immunology**, 65(2):187-191, 1988. Ciba-Geigy SA, Biovet, Unit, Centre Recherches Agricoles, CH-1566 St. Aubin/Fr, Switzerland.

McFARLANE, R.

(Una nueva técnica para el diagnóstico de la fiebre aftosa.) A new technique for the diagnosis of foot-and-mouth disease. **Proceedings United States Animal Health Association**, 91:317-323, 1987. Coll. Vet. Med., Univ., St Paul, MN 55108, USA.

NAIR, S.P., SURYANARAYANA, V.V.S., SEN, A.K.

(Estudios sobre estabilidad de almacenamiento de aftovirus tipos O y Asia-1 con varios preservativos). Studies on the storage stability of foot and mouth disease virus type 'O' and 'Asia-1' with various preservatives. *Indian Vet. J.*, 65(3):183-187, 1988. In: *Vet. Bull.*, 59(6):3289, 1989. Vet. Res. Inst., Bangalore-560 034, India.

OLIVER, R.E., DONALDSON, A.I., GIBSON, C.F., ROEDER, P.L., BLANC SMITH, P.M.Le, HAMBLIN, C.

(Detección de antígeno de fiebre aftosa en muestras de epitelio bovino: comparación por ELISA y por la prueba de fijación del complemento de sitios de recolección de muestras.) Detection of foot-and-mouth disease antigen in bovine epithelial samples: comparison of sites of sample collection by an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and complement fixation test. *Res. Vet. Sci.*, 44(3):315-319, 1988. Central Anim. Health Lab., Wallaceville Anim. Res. Centre, Private Bag, Upper Hutt, New Zealand.

PARRY, N.R., SYRED, A., ROWLANDS, D.J., BROWN, F.

(Una alta proporción de anticuerpos antipeptidos reconocen partículas de aftovirus.) A high proportion of anti-peptide antibodies recognize foot-and-mouth disease virus particles. *Immunology*, 64(4): 567-572, 1988. Wellcome Biotech., Langley Court, Beckenham, Kent BR3 3BS, UK.

PAY, T.W.F.

(Fiebre aftosa en ovinos y caprinos: una revisión). Foot and mouth disease in sheep and goats: a review. *FMD Bull.*, 26(3):2-13, 1988. In: *Vet. Bull.*, 59(2):835, 1989. Coopers Anim. Hlth Ltd., Pirbright, Woking, Surrey, UK.

PECH, R.P., HONE, J.

(Un modelo de dinámica y control de un brote de fiebre aftosa en cerdos salvajes en Australia.). A model of the dynamics and control of an outbreak of foot and mouth disease in feral pigs in Australia. *J. Applied Ecol.*, 25(1):63-77, 1988. In: *Vet. Bull.*, 58(7):4101, 1988. CSIRO, Div. Wildlife Rangelands Res., P.O.Box 84, Lyneham, ACT 2602, Australia.

PICCONE, M.E., KAPLAN, G., GIAVEDONI, L., DOMINGO, E., PALMA, E.L.

(VP1 de serotipos C de aftovirus: conservación de larga duración de las secuencias.) VP1 of serotype C foot-and-mouth disease viruses: long term conservation of sequences. *J. Virol.*, 62(4):1469-1473, 1988. Inst. Virol., Centro Invest. Ciencias Vet., INTA, Casilla Correo 77, 1708 Morón, Prov. Buenos Aires, Argentina.

PICCONE, M., ZULOAGA, G., MARCOVECCHIO, F., ARESE, A., MONESIGLIO, J.C., PALMA, E.L. Neutralización del virus de la fiebre aftosa O<sub>1</sub> Campos por anticuerpos inducidos por un péptido sintético. (Neutralization of aphthovirus O<sub>1</sub> Campos by antibodies induced with a synthetic peptide.) *Rev. Argentina Microbiol.*, 20(2):69-75, 1988. In: *FMD Bull.*, 27(2):89/33, 1989. Inst. Virol., Centro Invest. Ciencias Vet., INTA, Casilla Correo 77, 1708 Morón, Prov. Buenos Aires, Argentina.

PUJOL, C.A., FELEDI, C.A., MASSOUH, E.J.

(Unión para ensayos inmunológicos de aftovirus a glóbulos rojos de ovinos usando ácido tánico.) Coupling of foot-and-mouth disease virus to sheep red blood cells using tannic acid for immuno-logical assays. *J. Virol. Meth.*, 20(4):275-284, 1988. Lab. inmunoquím., Dpto. Química Biol., 4 piso, Pab. 1, FCEyN Ciudad Univ., Nuñez (1428) Cap. Fed., Argentina.

RAHMAN, H., DUTTA, P.K., DEWAN, J.N.

(Fiebre aftosa en elefante –*Elephas maximus*.) Foot and mouth disease in elephant (*Elephas maximus*). *J. Vet. Med. B*, 35(1):70-71, 1988. In: *Vet. Bull.*, 58(8):4750, 1988. Dep. Microbiol., G.B. Pant Univ., Pantnagar-263 145, Dist. Nainital, Uttar Pradesh, India.

RAHMAN, M.M., PRASAD, S., AHUJA, K.L., SHERMA, R.

(Aplicación de la prueba de ELISA para la detección de anticuerpos en sueros de búfalos vacunados contra la fiebre aftosa.) Application of enzyme labelled immunosorbent assay for the detection of antibodies in foot and mouth disease virus vaccinated buffalo sera. *Buffalo Bull.*, 7(1):8-11, 18, 1988. In: *Vet. Bull.*, 58(10):6105, 1988. Dep. Microbiol. Hygiene, B. Agric. Univ., Mymensingh, Bangladesh.

RAMARAO, D.

(Indices estacionales y meteorológicos correlacionan en la incidencia de fiebre aftosa en Andhra, Pradesh y Maharashtra.) Seasonal indices and meteorological correlates in the incidence of foot-and-mouth disease in Andhra, Pradesh and Maharashtra. *Indian J. Anim. Sci.*, 58(4):432-434, 1988. In: *Vet. Bull.*, 59(9):5115, 1989. Vet. Res. Inst., Izatnagar, Uttar Pradesh 243 122, India.

RAMARAO, D., RAO, B.U.

(Distribución y ocurrencia de tipos de aftovirus en India, de 1971 a 1985.) The occurrence and distribution of foot and mouth disease virus types in India from 1971 to 1985. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 7(2):357-364, 1988. Vet. Res. Inst., Hebbal, Bangalore 560 024, India.

SAHA, S.N.

(Sustitución de aminoácidos y fosfato de triptosa por hidrolisados proteicos para el crecimiento de aftovirus en células BHK-21.) Replacement of amino acids and tryptose phosphate broth with protein hydrolysates for the growth of FMD virus in BHK-21 cells. *Indian Vet. J.*, 65(9):757-760, 1988. In: *Vet. Bull.*, 59(8):4605, 1989. Indian Vet. Res. Inst., Bangalore Campus, Karnataka 560 024, India.

SAMUEL, A.R., KNOWLES, N.J.

(Estudio serológico y bioquímico de un aislado de tipo A de aftovirus de Bavaria en 1984.) Serological and biochemical study of an isolate of foot and mouth disease virus type A from Bavaria in 1984. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 7(3):365-373, 1988. World Reference Laboratory for Foot-and-Mouth Disease, Inst. Anim. Dis. Res., Pirbright Laboratory, Ash Road, Pirbright, Woking, Surrey GU24 0NF, UK.

SAMUEL, A.R., KNOWLES, N.J., KITCHING, R.P.

(Análisis serológico y bioquímico de algunos aislados recientes del aftovirus tipo A del Oriente Medio.) Serological and biochemical analysis of some recent type A foot-and-mouth disease virus isolates from the Middle East. *Epid. Infect.*, 101(3):577-590, 1988. World Ref. Lab. FMD, AFRC Inst. Anim. Hlth, Pirbright, Woking, Surrey GU24 0NF, UK.

SAMUILENKO, A.Ya., SKICHKO, N.D., EREMETS, V.I., KAZAROV, M.A., POLYAKOV, A.Yu., BOIKO, A.A., MASLOV, E.V.

(Aplicación de la prueba de ELISA para estimar la inmunidad a la fiebre aftosa. Application of immunoenzyme assay to assessing immunity to foot and mouth disease.) Texto en ruso. *Veterinarya*, Moscow, USSR, 4:29-31, 1988. In: *Vet. Bull.*, 58(9):5282, 1988.

SANGAR, D.V., CLARK, R.P., CARROLL, A.R., ROWLANDS, D.J., CLARKE, B.E.

(Modificación de la proteína principal —Lb— del aftovirus.) Modification of the leader protein (Lb) of foot-and-mouth disease virus. *J. gen. Virol.*, 69(9):2327-2333, 1988. Dep. Virol. Wellcome Biotech. Ltd., Langley Court, Beckenham, Kent BR3 3BS, UK.

SEN, A.K.

(Mantenimiento a 4°C de la calidad del aftovirus purificado y concentrado.) Keeping quality of purified foot-and-mouth disease virus at 4°C. *Indian J. Virol.*, 3(1-2):71-75, 1987, publ. 1988. In: *Vet. Bull.*, 59(1):142, 1989. Vet. Res. Inst., Bangalore 560 024, India.

SHAZHKO, Zh.A., MISHCHENKO, V.A.

(Variante de fase sólida de la prueba de fijación del complemento para fiebre aftosa. Solid-phase variant of the complement fixation test for foot and mouth disease.) Texto en ruso. *Laboratornoe Delo*, 6:49-52, 1988. In: *Vet. Bull.*, 59(8):4606, 1989. Vsesoyuznyi Yashchurnyi Institut, gorod Vladimir, USSR.

SHIMSHONY, A.

(Fiebre aftosa en gacelas de montaña en Israel.) Foot and mouth disease in the mountain gazelle in Israel. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 7(4):917-923, 1988. Vet. Serv. Anim. Hlth, Ministry of Agriculture, P.O.Box 12, Beit-Dagan 50200, Israel.

SOLISCH, P., WAZEL, W., MÖLLER, C., DIETZ, G.

(Sección ultrafina del aftovirus. Ultrathin section of foot and mouth disease virus). Texto en alemán. *Arch. Exper. Vet.*, 42(2):288-293, 1988. In: *Vet. Bull.*, 59(1):149, 1989. Friedrich Loeffler Inst., Insel Riems, DDR-2201, German Democratic Republic.

SRINIVASAN, V.A., RAMAKRISHNAN, S., BELWAL, L.M.

(Investigación de brotes de fiebre aftosa y control por vacunación en Misore en el distrito de Karnataka.) Investigation of foot and mouth disease outbreaks and control by vaccination in Mysore district of Karnataka. *Indian Vet. J.*, 64(8):633-636, 1987. In: *Vet. Bull.*, 58(10): 6102, 1988. Indian Immunologicals, Hyderabad-500 004, India.

STROBBE, R., CLERCQ, K. de, DEBECQ, J.

(Estimación de inmunidad adquirida de la madre en ratones lactantes para evaluar la vacuna antiaftosa.) Estimation of maternally acquired immunity in suckling mice to evaluate foot-and-mouth disease vaccine. *Arch. Exper. Vet.*, 42(3):410-413, 1988. In: *Vet. Bull.*, 59(1):143, 1989. Nat. Inst. Vet. Res., Groeselenberg 99, B-1180, Brussels, Belgium.

STROBBE, R., CLERCQ, K. de, OPDENBOSCH, E. van, WELLEMANS, G., DEBECQ, J.

(Respuesta serológica a la vacunación antiaftosa en bovinos de diferentes edades.) Serological response to foot-and-mouth disease vaccination in cattle of different ages. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 57(3):199-206, 1988. In: *Vet. Bull.*, 58(10):6103, 1988. Nat. Inst. Vet. Res., Groeselenberg 99, B-1180 Brussels, Belgium.

SUROVOI, A.Yu, VOL'PINA, O.M., IVANOV, V.T., CHEPURKIN, A.V., IVANYUSHCHENKOV, V.N., BURDOV, A.N., DRYAGALIN, N.N.

(Copias de epítopes protectores de la proteína VP<sub>1</sub> de los aftovirus tipo O y A por péptidos sintéticos. Mimicking protective epitopes of VP<sub>1</sub> protein of foot-and-mouth disease virus types O and A by synthetic peptides.) Texto en ruso. *Bioorganicheskaya Khimiya*, 13(8):1132-1135, 1987. In: *Vet. Bull.*, 59(2):833, 1989. Inst. Bioorganic Chemistry, Acad. Sci., Moscow, USSR.

SWANEY, L.M.

(Una línea celular continua de riñón de bovino para pruebas de rutina de aftovirus.) A continuous bovine kidney cell line for routine assays of foot-and-mouth disease virus. *Vet. Microbiol.*, 18(1): 1-14, 1988. Dep. Agric., Anim. Dis. Center, P.O.Box 848, Greenport, NY 11944, USA.

THOMAS, A.A.M., WOORTMEIJER, R.J., BARTELING, S.J., MELOEN, R.H.

(Evidencia para más de un sitio importante de neutralización de aftovirus.) Evidence for more than one important, neutralizing site on foot-and-mouth disease virus. *Arch. Virol.*, 99(3/4):237-242, 1988. Centraal Diergeneskundig Inst., Vestiging Virol., postbus 365, NL-8200 AJ Lelystad, Netherlands.

THOMAS, A.A.M., WOORTMEIJER, R.J., PUIJK, W., BARTELING, S.J.

(Sitios antigenicos del aftovirus tipo A10). Antigenic sites on foot-and-mouth disease virus type A10. *J. Virol.*, 62(8): 2782-2789, 1988. Central Vet. Inst., Dep. Virol., 8200 AJ Lelystad, Netherlands.

THOMSON, G.R., DOUBE, B.M., BRAAK, L.E.O., GAINARU, M.D., BENGIS, R.G.

(Deficiencia de *Haematobia thirouxi potans* —Bezzi— de transmitir aftovirus mecánicamente entre bovinos virémicos y susceptibles.) Failure of *Haematobia thirouxi potans* (Bezzi) to transmit foot-and-mouth disease virus mechanically between viraemic and susceptible cattle. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 55(2):121-122, 1988. Vet. Res. Inst., P.O.Onderstepoort 0110, South Africa.

TORRE, J.C. de la, MARTINEZ-SALAS, E., DIEZ, J., VILLAVERDE, A., GEBAUER, F., ROCHA, E., DAVILA, M., DOMINGO, E.

(Coevolución de células y virus en una infección persistente de aftovirus en cultivos celulares.) Co-evolution of cells and viruses in a persistent infection of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J. Virol.*, 62(6):2050-2058, 1988. Cent. Biol. Mol., Univ. Autónoma, Canto Blanco, 28049 Madrid, España.

VALPEDRA, M., MODA, G.

(Control de fiebre aftosa epidémica: una experiencia regional. Control of epidemic foot and mouth disease: a regional experience.) Texto en italiano. *Praxis Veterinaria*, 9(1):8-10, 1988. In: *Vet. Bull.*, 58(7):4098, 1988. Servizio Vet., Piemonte, Italia.

VILLAVERDE, A., MARTINEZ-SALAS, E., DOMINGO, E.

(Gene 3D del aftovirus. Conservación por convergencia de las secuencias medias.) 3D gene of foot-and-mouth disease virus. Conservation by convergence of average sequences. *J. Molec. Biol.*, 204(3): 771-776, 1988. In: *Vet. Bull.*, 59(9):5117, 1989. Centr. Biol. Mol., Univ. Autónoma, Canto Blanco, 28049 Madrid, España.

WESTBURY, H.A., CHAMMANPOOD, P., TANGCHAITRONG, S., DOUGHTY, W.J.

(Prueba de ELISA de dilución simple para la detección de anticuerpos séricos de aftovirus en bovinos.) Single dilution ELISA for detection of serum antibody to foot-and-mouth disease virus in cattle. *Vet. Microbiol.*, 18(3-4):273-283, 1988. Australian Anim. Health Lab., P.O.Bag 24, Geelong, Vic. 3220, Australia.

WILSON, V., TAYLOR, P., DESSELBERGER, U.

(Regiones cruzadas en recombinantes de aftovirus corresponden a regiones de estructura secundaria local elevada.) Crossover regions in foot-and-mouth disease virus (FMDV) recombinants correspond to regions of high local secondary structure. *Arch. Virol.*, 102(1-2): 131-139, 1988. U. Desselberger, Reg. Virus Lab., East Birmingham Hosp., Birmingham B9 5ST, UK.

---

**BOLETIN DEL CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA****INVITACION A LOS AUTORES**

El BOLETIN del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa es una revista trimestral, bilingüe (español e inglés) del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. En ella se publican trabajos que se juzgan de interés para las actividades relacionadas con los programas de prevención o de lucha contra las enfermedades vesiculares 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.

**INSTRUCCIONES A LOS AUTORES**

1. Todos los trabajos que se presenten para su publicación en el BOLETIN deben estar escritos a máquina, a doble espacio, en un sola cara del papel, tamaño carta (28 x 22 cm).
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. Los trabajos pueden enviarse en inglés o español o, de preferencia, en ambos idiomas. Los trabajos que se presenten en un solo idioma serán traducidos al otro por disposición del Comité Editorial, el que se reserva el derecho de aprobar las traducciones.
6. El Comité Editorial se reserva también 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.
7. Publicado el trabajo, cada autor recibirá gratuitamente 25 separatas del mismo.

**COMITE EDITORIAL**

Dr. Raúl Casas Olascoaga, Director  
Dr. A. Alonso F., Jefe de los Laboratorios  
Dr. Vicente M. Astudillo, Jefe de Asistencia Técnica  
Dr. Jaime Estupiñán A., Epidemiólogo

**PAN-AMERICAN FOOT-AND-MOUTH DISEASE CENTER BULLETIN****INVITATION TO CONTRIBUTORS**

The BOLETIN is a quarterly bi-lingual journal of the Pan-American Foot-and-Mouth Disease Center. It publishes articles relating to all aspects of work in laboratory, field and program activities of vesicular 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.

**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.
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. Manuscripts may be presented in Spanish and/or English. The Editorial Committee will provide translation services on request. Final decisions on translations rest with the Editorial Committee.
6. The Editorial Committee 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.
7. Authors will receive 25 reprints of articles published. In special cases, extra reprints may be arranged.

**EDITORIAL COMMITTEE**

Dr. Raúl Casas Olascoaga, Director

Dr. A. Alonso F., Chief, Laboratory Services

Dr. Vicente M. Astudillo, Chief, Technical Assistance

Dr. Jaime Estupiñán A., Epidemiologist