

# BOLETIN

del  
centro panamericano  
de  
fiebre aftosa

58



organización panamericana de la salud  
oficina sanitaria panamericana, oficina regional de la  
organización mundial de la salud

---

# BOLETIN

del

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa

---

Nº 58, enero-diciembre 1992  
Nº 58, January-December 1992

contenido  
contents

Editorial .....	3
Editorial .....	4
Tratamiento de suspensiones de virus con triclorotrifluoretano para la producción de vacuna antiaftosa en sistema industrial .....	5
Treatment of virus suspensions with trichlorotrifluorethane for the produc- tion of foot-and-mouth disease vaccine on an industrial scale .....	10
<i>G.C. Darsie, R.G., Cunha, I. Gomes</i>	
Producción de vacuna antiaftosa: Filtrabilidad del suero bovino tratado con polyetilenglicol y su efecto en el crecimiento celular .....	15
Production of foot-and-mouth disease vaccine: Filterability of cattle serum treated with polyethyleneglycol and its effect on cell growth .....	20
<i>J.L. Reis, F.B. Rangel Filho, A. Alonso, J.A. Mesquita</i>	
Anticuerpos monoclonales específicos para herpesvirus bovino tipo 1 (cepa Cooper) .....	25
Monoclonal antibodies against bovine herpes virus Type 1 (Cooper strain) ..	35
<i>M.T.C. Winkler, F.A. Osorio, M.S.Søndahl, F.B. Rangel Filho, H. Barahona</i>	
Producción de anticuerpos monoclonales contra antígenos grupo específicos del virus de la lengua azul .....	44
Production of monoclonal antibodies against group-specific bluetongue virus antigens .....	50
<i>M.M. Kanashiro, E.C. Contreiras, A. Alonso, H. Barahona</i>	

Desarrollo de una prueba ELISA para identificar anticuerpos antivirales de estomatitis vesicular Indiana-3 .....	55
Development of an ELISA test to identify antibodies to vesicular stomatitis (Indiana-3) virus .....	63
<i>R. Allende, L.M. Sepúlveda, A. Alonso, F.B. Rangel Filho</i>	
Heterogeneidad entre tres cepas del virus de la fiebre aftosa, subtipo A <sub>24</sub> Cruzeiro, usadas para la producción de vacunas .....	71
Heterogeneity among three foot-and-mouth disease subtype A <sub>24</sub> Cruzeiro virus strains used for the production of vaccines .....	79
<i>J. J. Trinidad, V. Malirat, I. E. Bergmann</i>	
Aislamiento del virus de la fiebre aftosa en animales de laboratorio.	
I. Limitaciones de la información disponible .....	87
Isolation of foot-and-mouth disease virus in laboratory animals.	
I. Limitations of available information .....	92
<i>O. J. Degregorio, V.M. Varela-Díaz</i>	
Aislamiento del virus de la fiebre aftosa en animales de laboratorio	
II. Susceptibilidad comparativa de seis especies .....	97
Isolation of foot-and-mouth disease virus in laboratory animals	
II. Comparative susceptibility of six species .....	103
<i>O. J. Degregorio, V.M. Varela-Díaz, M.S. Söndahl, H.S. Paim</i>	
Caracterización molecular de cepas del virus de la fiebre aftosa usadas para la producción de vacunas en Sudamérica .....	109
Molecular characterization of foot-and-mouth disease virus strains used for vaccine production in South America .....	119
<i>I.E. Bergmann, V. Malirat, P. J. V. Pereira</i>	
Resúmenes - Abstracts .....	128
Bibliografía sobre enfermedades vesiculares - Bibliography on vesicular diseases .....	138

Editado e Impreso en el  
CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA (OPS/OMS)  
Caixa Postal 589, 20001-970 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

## EDITORIAL

En esta edición del BOLETIN se presenta una serie de trabajos realizados en el marco de los programas de posgrado del Instituto de Veterinaria de la Universidad Federal Rural de Rio de Janeiro y de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires, con la cooperación técnica del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (PANAFTOSA). Específicamente, los artículos que están comprendidos en este volumen tratan sobre algunos aspectos de interés para la producción de vacuna antiaftosa, la variabilidad de cepas vacunales, y el diagnóstico serológico y virológico de la fiebre aftosa y otras virosis de importancia para la salud animal. Se estima que los mismos representan un ejemplo de los múltiples beneficios que pueden derivarse de la vinculación entre PANAFTOSA y las Universidades, en aspectos de interés común.

En general, esta interacción sugiere la utilidad que puede aportar el establecimiento y consolidación de lazos colaborativos entre las Universidades y los programas de sanidad animal del Continente. Esta interrelación permitiría aunar esfuerzos, recursos y criterios; identificar problemas prioritarios y las posibles vías para encararlos; fomentar el intercambio y la diseminación de información; integrar los aspectos teóricos y prácticos del conocimiento; mantener vigente la preocupación por los problemas sanitarios de interés en el medio local y consecuentemente, fortalecer la participación conjunta en su solución.

Además, con este volumen del BOLETIN se inicia una serie de artículos que tratan sobre la caracterización molecular de las cepas vacunales y de campo aislados en América del Sur. Se estima que esta información sea de particular interés para disponer de un banco de datos que contribuya a la evaluación del origen de los brotes que ocurran en nuestro Continente.

### *Reconocimientos*

El Comité Editorial agradece a los doctores Marcelo G. Costantini, Stephen Potkay, Emilio A. Coltorti y Timothy R. Doel por su colaboración en la revisión de los manuscritos.

## EDITORIAL

This edition of the BOLETIN presents a series of studies carried out within the framework of the postgraduate programs of the Veterinary Institute, Federal Rural University of Rio de Janeiro and the Faculty of Veterinary Sciences, University of Buenos Aires, with the technical cooperation of the Pan American Foot-and-Mouth Disease Center (PANAFTOSA). Specifically, the articles in this volume are concerned with selected aspects of interest to the production of foot-and-mouth disease vaccines, the variability of vaccine strains, and the serologic and virologic diagnoses of foot-and-mouth disease and other viral diseases of animal health importance. These papers represent an example of the multiple benefits that may be derived from the linkage between PANAFTOSA and the Universities, in matters of mutual concern.

In general, this interaction suggests the benefits that may arise from the establishment and consolidation of collaborative links between the Universities and animal health programs of this Continent. This interrelationship favors the joining of efforts, resources and criteria; identifying priority problems and possible approaches to face them; developing the exchange and dissemination of information; integrating theoretical and practical aspects of current knowledge; maintaining the concern on sanitary problems at the local level, and consequently, strengthening the joint participation towards their solution.

Also, a new series of articles on the molecular characterization of field and vaccine strains is initiated with this volume of the BOLETIN. It is estimated that this information is of particular interest to render available a data bank to contribute to the evaluation of the origin of the outbreaks that may occur in our Continent.

### *Acknowledgements*

The Editorial Committee is grateful to Doctors Marcelo G. Costantini, Stephen Potkay, Emilio A. Coltorti and Timothy R. Doel for their collaboration in reviewing the manuscripts.

## TRATAMIENTO DE SUSPENSIONES DE VIRUS CON TRICLOROTRIFLUORETANO PARA LA PRODUCCION DE VACUNA ANTIAFTOSA EN SISTEMA INDUSTRIAL

G.C. DARSIE<sup>1</sup>, R.G. CUNHA<sup>2</sup>, I. GOMES<sup>1</sup>

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

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

<sup>2</sup>Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense,

Rua Vital Brazil Filho 64, 24220 Niterói RJ, Brasil

**Resumen.** Suspensiones del virus de la fiebre aftosa se trataron a escala industrial con 1% v/v de triclorotrifluoretano (TTE) o cloroformo para determinar la viabilidad de su uso como agente alternativo para la purificación parcial de antígenos vacunales. En las suspensiones tratadas con cloroformo hubo una disminución media del 50,4% del contenido proteico total, mientras que en aquellas tratadas con TTE la reducción fue del 33,4%. Las vacunas formuladas con los antígenos tratados con cualquiera de las soluciones no presentaron diferencias significativas en la inducción de inmunidad cuando se evaluaron por la expectativa porcentual de protección (EPP) en bovinos jóvenes primovacunados. No se observaron inconvenientes en la manipulación del TTE ni aparecieron reacciones posvacunales indeseables.

El virus de la fiebre aftosa es un representante de la familia *Picornaviridae* y con sus siete serotipos representa el género *Aphthovirus*. Su virión está formado por una cadena simple de ácido ribonucleico revestida por un capsídeo proteico sin envoltura (3) que le confiere la característica de resistencia a solventes orgánicos como el cloroformo (26) y los fluorocarbonos (16).

Las vacunas antiaftosa, aplicadas conjuntamente con otras medidas, han sido una gran arma de combate para el control de la enfermedad. Los antígenos se obtienen por replicación del virus en cultivos celulares *in vitro*. Debido a la característica lisogénica de su ciclo de replicación, el virus mata, al final del cultivo, a las células utilizadas como sustrato. Los restos celulares ricos en proteínas, lípidos y otros componentes son dispersos en el medio y, si no se les retira, se incorporan a la vacuna

como antígenos. Por ese motivo, se hace necesaria una purificación parcial de las suspensiones virales con 1% de cloroformo, bajo agitación o a través de un homogeneizador, seguido de clarificación, filtración o centrifugación continua (7).

Aunque eficaz, la utilización de cloroformo es problemática por la turbidez que ocasiona en las suspensiones obtenidas a partir de cultivos celulares que utilizan suero bovino tratado con polietilenglicol (PEG) para remover los anticuerpos (1), así como por el desgaste que provoca en los equipos, los riesgos de accidentes por intoxicación aguda y las dificultades crecientes para adquirirlo en algunos países debido a su utilización clandestina en la purificación de drogas.

En la búsqueda de un solvente para substituir el cloroformo como agente purificador de suspensiones virales a nivel industrial se planteó la posibilidad de usar triclorotrifluoretano (TTE). No se encontraron referencias relacionadas con la estabilidad de los antígenos durante su almacenamiento, ni de la de vacunas oleosas producidas con

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

estos, como tampoco sobre la posible ocurrencia de reacciones posvacunales indeseables en bovinos.

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos en la evaluación de estas incógnitas, además de los relacionados con la reducción significativa de la concentración de uso.

## MATERIALES Y METODOS

En el marco de la rutina de producción de antígenos en la Planta Piloto de Producción de Vacunas del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, se prepararon nueve suspensiones monovalentes de 300 litros de volumen cada una. Cinco fueron de la cepa O<sub>1</sub> Campos-Br/58 (OCAM); dos de la cepa A<sub>24</sub> Cruzeiro-Br/55 (ACRU); una de la cepa A-79 Venceslau-Br/76 (AVEN); y otra de la cepa C<sub>3</sub> Indaial-Br/71 (CIND).

Se cultivaron células BHK<sub>21</sub>C13 en tanques con capacidad de 120 a 600 litros. Como sustrato se utilizó medio Eagle con 8% de suero bovino tratado con PEG y esterilizado por filtración en cartucho con membrana de 0,22 µm de retención (8). Los cultivos destinados a la producción de virus en suspensión tuvieron el medio de crecimiento decantado después de la sedimentación de las células. Aquellos que se destinaban a la producción en botellas rolantes se diluyeron a la concentración de  $0,2 \times 10^6$  cél/ml en medio Eagle adicionados con 8% de suero sin tratar, y el medio se retiró después de 72 horas de crecimiento.

Los cultivos celulares se inocularon con semillas de virus de bajo pasaje en células BHK<sub>21</sub>C13, a una proporción de 0,02-0,06 partículas virales infectantes por célula, en medio Eagle sin suero que contenía 30% de una solución 0,2M de Tris-hidroximetilaminometano.

Al final del período de replicación viral, las suspensiones se enfriaron a 4°C. Volúmenes de 10 litros se trataron con 1% de cloroformo bajo agitación con barra magnética por 30 minutos en balones de vidrio. El resto se trató con 1% de TTE empleando un homogeneizador en circuito cerrado, a 3500 rpm por 1 hora. Después del período de reposo de 18 horas a 4°C, los sobrenadantes se centrifugaron a 7680 g.

Todas las suspensiones se inactivaron en etilenimina binaria (6) a una concentración final de 3mM durante 24 horas a 26°C. El inactivante se hidrolizó con tiosulfato de sodio 1M, inmediatamente antes de la utilización de los antígenos.

Durante la producción, todo el proceso se controló a través de pruebas biológicas y físico-químicas de rutina (11). Para evaluar la eficiencia de los tratamientos, en algunas suspensiones se determinó el contenido proteico total antes de la adición del solvente, y después de la clarificación (9).

Con los nueve antígenos monovalentes tratados con TTE o cloroformo se elaboraron 18 vacunas pareadas para pruebas de potencia, inocuidad y estabilidad inmunogénica con 300 días de almacenamiento a 4°C. Volúmenes de dos antígenos monovalentes OCAM y de dos monovalentes ACRU se conservaron por 240 días a 4°C y tras ese período, se produjeron ocho vacunas pareadas para prueba de potencia.

Todas las vacunas se formularon con adyuvante incompleto de Freund (2,15), según metodología descrita por Abaracón *et al.* (2).

La influencia de los tratamientos sobre la inmunogenicidad de los antígenos se evaluó mediante la prueba de expectativa porcentual de protección (EPP), con base en los índices de anticuerpos en el suero de bovinos primovacunados, determinados por seroprotección en ratones lactantes, o seroneutralización en cultivo celular (24,28).

Todos los resultados se sometieron a análisis estadístico por la prueba de Tukey o por análisis de varianza con  $P > 0,05$  (24,28).

## RESULTADOS

En este trabajo se presentan los hallazgos referentes a la acción del TTE como agente para la purificación parcial en comparación con el cloroformo, así como la estabilidad inmunogénica de las vacunas producidas con los antígenos tratados. El Cuadro 1 presenta los resultados referentes a la purificación parcial de las suspensiones estudiadas.

Estos valores indican que hubo una media de 33,4% del contenido proteico total en las suspensiones tratadas con TTE y de 50,4% en las tratadas con cloroformo, siendo esta diferencia estadísticamente significativa.

Los resultados obtenidos con las 18 vacunas pareadas probadas luego de su producción (0 DPP) se presentan en el Cuadro 2.

Se puede constatar que las respuestas inmunogénicas son alternadas, lo que favorece uno u otro antígeno de la misma cepa, pero sin caracterizar el predominio de influencia de los tratamientos. Para las ocho vacunas conservadas a 4°C por 300 días (300 DPP), los resultados presentados en el Cuadro 3 indican una disminución de la respuesta inmunitaria con relación a los datos obtenidos con 0 DPP.

**CUADRO 1.** Contenido proteico total (mg/ml) en suspensiones virales tratadas con 1% de triclorotrifluoretano (TTE) o cloroformo (CLO).

Suspensión	Proteínas totales (mg/ml)			% reducción	
	Sin tratar	TTE	CLO	TTE	CLO
A	0,41	0,28	0,20	31,7	51,2
B	0,35	0,23	0,18	34,3	48,6
C	0,45	0,30	0,22	34,0	51,5

Para las vacunas producidas con los antígenos almacenados a 4°C por 240 días (240 DPP), los resultados también indican una disminución de la respuesta (Cuadro 4) con relación a 0 DPP, aunque de intensidad menor que en los observados con 300 DPP.

**CUADRO 2.** Valores del límite inferior de confianza de expectativa porcentual de protección (EPP) alcanzados por la vacunas formuladas con antígenos recién producidos ("Cero" DPP), tratados con triclorotrifluoretano (TTE) o cloroformo (CLO).

Vacunas		EPP "CERO" DPP	
		TTE	CLO
OCAM*	1599	78,7	87,5
OCAM	1602	91,3	93,0
OCAM	1605	85,0	84,6
OCAM	1606	89,6	86,8
OCAM	1607	96,1	95,6
ACRU	1613	83,2	88,4
ACRU	1622	96,4	94,6
AVEN	1604	84,3	90,8
CIND	1603	98,5	99,0

\*OCAM-O1 Campos-Br/58; ACRU-A24 Cruzeiro-Br/55; AVEN-A-79 Venceslau-Br/76; CIND-C3 Indaial-Br/71.

**CUADRO 3.** Valores del límite inferior de confianza de expectativa porcentual de protección (EPP) alcanzados por vacunas conservadas a 4°C por 300 días posproducción (300 DPP) con antígenos tratados con triclorotrifluoretano (TTE) o cloroformo (CLO).

Vacunas	EPP 300 DPP	
	TTE	CLO
OCAM* 1599	67,5	65,6
OCAM 1602	81,5	83,3
ACRU 1613	80,5	83,9
ACRU 1622	82,4	86,1

\*OCAM-O1 Campos-Br/58; ACRU-A24 Cruzeiro-Br/55.

El análisis de varianza aplicado en los resultados revela diferencias significativas en las EPPs obtenidas en los diferentes tiempos estudiados, así como entre las cepas utilizadas. No hubo diferencia significativa entre las respuestas inmunitarias inducidas por las vacunas formuladas con antígenos tratados con TTE o cloroformo.

En el experimento se vacunaron 622 terneros y en ningún caso se presentaron reacciones posvacunales indeseables.

**CUADRO 4.** Valores del límite inferior de confianza de expectativa porcentual de protección (EPP) obtenidos por vacunas formuladas con antígenos tratados con triclorotrifluoretano (TTE) o cloroformo (CLO) y almacenados a 4°C por 240 días posproducción (240 DPP).

Vacunas		EPP 240 DPP	
		TTE	CLO
OCAM* 1599		77,8	89,0
OCAM 1602		79,1	79,9
ACRU 1613		80,4	80,9
ACRU 1622		90,0	83,0

\*OCAM-O1 Campos-Br/58; ACRU-A24 Cruzeiro-Br/55.

En la práctica, se observa que hubo una evidente disminución en el tiempo de sedimentación de los restos celulares y que no ocurrió turbidez en las suspensiones tratadas con TTE, en comparación con aquellas tratadas con cloroformo. Tampoco se observaron inconvenientes en cuanto a su manipulación, tales como olores tóxicos o daños en los equipos.



## DISCUSION

En este estudio se obtuvo una reducción media de 33,4% del contenido proteico en las suspensiones del virus de la fiebre aftosa, cuando estas se trataron solo con 1% de TTE en un ciclo único. En las referencias bibliográficas consultadas se encuentra información sobre altos grados de purificación de suspensiones virales, pero usando hasta 50% de clorofluorocarbonos (16), y después de un número elevado de ciclos alternados de tratamiento y centrifugación (14). El excelente desempeño registrado se puede atribuir al proceso de mezcla mediante un homogeneizador de alta potencia, que proporcionó una mejor dispersión e interacción del solvente. Cabe resaltar que Manson *et al.* (23) obtuvieron resultados semejantes en estudios con poliovirus después de dos ciclos en la proporción de 50%.

La utilización de fluorocarbonos líquidos en procesos biológicos se inició con Gessler (16), purificando suspensiones de virus de la viruela y del sarcoma de Rous. Otros procesos se desarrollaron para purificar virus de poliomiélitis, adenovirus y colífago T5 (23), para eliminar factores anticomplementarios de las suspensiones de virus de poliomiélitis (20) y Coxsackie (18), y para la disociación de complejos formados por virus de la poliomiélitis y anticuerpos (19).

El TTE es un clorofluorocarbono líquido incoloro, no inflamable, y de bajo grado de toxicidad, utilizado en la industria electrónica como agente de limpieza de componentes de alta tecnología. Existen referencias sobre su uso en la purificación del virus de la fiebre aftosa para identificar partículas virales por microscopía electrónica (5), así como en estudios sobre la actividad fijadora del complemento (25), la disociación de complejos virus-anticuerpos (29,31), la purificación para concentrar por PEG (13), y para la producción de vacunas de diferentes tipos (4,10,14,21,22,27).

Al comparar con el tratamiento hecho con cloroformo, el TTE mostró una desventaja, aunque esta situación se puede disminuir y hasta revertir, utilizando una mayor proporción de TTE o un número mayor de ciclos de tratamiento.

En relación a la respuesta inmunológica inducida por las vacunas examinadas, los resultados indican que no hubo perjuicio en la capacidad

antigénica de las suspensiones tratadas con TTE en comparación con aquellas tratadas con cloroformo. Esto confirma los hallazgos de otros autores (10,14,22,27), y reafirma la posibilidad de la utilización alternativa del TTE para el tratamiento industrial de suspensiones de virus de la fiebre aftosa.

## RECONOCIMIENTOS

Los autores agradecen a la Prof. Elizabeth B.B. Pereira, a los Drs. Raúl Casas Olascoaga, Vicente M. Astudillo, Ubiratan Mendes Serrão y Alberto Knust Ramalho por la colaboración recibida.

Este trabajo fue presentado por el autor principal a la Universidad Federal Rural de Rio de Janeiro en cumplimiento parcial de los requisitos para el título de *Magister Scientiae* en Patología Veterinaria en el área de concentración de Medicina Veterinaria Preventiva.

## REFERENCIAS

1. ABARACON, D., GIACOMETTI, H. Vacunas contra la fiebre aftosa con virus producido en cultivos celulares con suero bovino tratado por polietilenglicol. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 21-22: 44-48, 1976.
2. ABARACON, D., MESQUITA, J.A., SALLUA, S., PEREZ RAMA, R. Emulsificante montanide 888 para la preparación de vacunas antiaftosa con adyuvante oleoso. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 45-46: 51-53, 1982.
3. ANDREWES, C.H. *Viruses of vertebrates*. 5ª ed., London, 1989. p. 121-143.
4. AUGÉ DE MELLO, P., ASTUDILLO, V., GOMES, I., CAMPOS GARCIA, J.T. Aplicación en el campo de vacuna antiaftosa oleosa y inactivada: vacunación y revacunación de bovinos jóvenes. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 19-20: 31-37, 1975.
5. BACHRACH, H.L., BREESE, S.S. Purification and electron microscopy of foot-and-mouth disease virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 97: 659-665, 1958.
6. BAHNEMANN, H.G. Binary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production. *Arch. Virol.*, 47: 47-56, 1975.

7. BAHNEMANN, H.G., MESQUITA, J.A. Vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 53: 19-24, 1987.
8. BAHNEMANN, H.G., MESQUITA, J.A., ASTUDILLO, V., DORA, F. The production and application of an oil adyuvant vaccine against foot-and-mouth disease in cattle. In: *8th Meet. Europ. Soc. for Anim. Cell Technol. Modern Approaches to Animal Cell Technology*. Butterwoths, Butterworth e Co., 1987. p. 628-639.
9. BRADFORD, M.M. Rapid scientific methods for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248, 1976.
10. BROWN, F., CARTWRIGHT, B. Purification of the virus of foot-and-mouth disease by fluorocarbon treatment and its dissociation from neutralizing antibody. *J. Immunol.*, 85: 309-313, 1960.
11. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA. *Manual de procedimientos para el control de vacuna antiaftosa*. Rio de Janeiro, PANAFTOSA, 1980. 47 p. (Ser. Man. Técnicos, 2).
12. 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: 243-267, 1957.
13. FAYET, M.T. Concentration du virus de la fièvre aphteuse par le polyéthylène glycol. *Ann. Inst. Pasteur*, 118: 356-366, 1970.
14. FAYET, M.T., ROUMIANTZEFF, M., DUBOUCLARD, C., FONTAINE, J. Utilisation d'un fluorocarbone comme méthode d'étude du virus de la fièvre aphteuse. *Ann. Inst. Pasteur*, 109: 652-662, 1965.
15. FREUND, J., THOMPSON, K.M. A simple rapid technique of preparing water in oil emulsion of penicilin, drugs and biologicals. *Science*, 101: 468-469, 1945.
16. GESSLER, A.E. A new and rapid method for isolating viruses by selective fluorocarbon deproteinization. *Trans. N.Y. Acad. Sci.*, 18, Ser. II, (8): 701-703, 1956.
17. GOMES, I., ASTUDILLO, V. 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.
18. HAMPARIAN, V., MÜLLER, F., HUMMELER, K. Elimination of nonspecific components from viral antigens by fluorocarbon. *J. Immunol.*, 80: 468-475, 1958.
19. HUMMELER, K., KETLER, A. Dissociation of poliomyelitis virus from neutralizing antibody. *Virology*, 6: 297-299, 1958.
20. HUMMELER, K., HAMPARIAN, V. Removal of anticomplementary activity and host antigens from viral preparations by fluorocarbon. *Science*, 125: 547-548, 1957.
21. KLIMOV, N.M., MALAKHOV, A.G., GRIBANOV, V.N. Chemical purification of lapinized foot-and-mouth disease virus and trials of its antigenic and immunogenic properties. *Trudy Vsesoyus. Inst. Eksp. Vet.*, 24: 208-214, 1961.
22. MACKOWIAK, C., FONTAINE, J. Utilisation de virus traites au fluorocarbone pour la préparation du vaccin antiaphteux. In: *XVIII Congrès Mondial Vétérinaire*, Paris, 17-22 Jul. 1967. p. 383-386.
23. MANSON, L.A., ROTHSTEIN, E.L., RAKE, G.W. Purification of poliovirus with fluorocarbon. *Science*, 125: 546-547, 1957.
24. PIMEMTEL GOMES, F. *Curso de estatística experimental*. Piracicaba, SP, USP/ESALQ, 1971, 621 p.
25. POLATNICK, J. Studies on the small particle complement-fixing antigen of foot-and-mouth disease virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 103: 27-31, 1960.
26. PYL, G. Chloroform treatment of brain material infected with neurotropic viruses. *Exp. Vet. Med.*, 5: 1-5, 1951.
27. ROUMIANTZEFF, M., FONTAINE, J., DUBOUCLARD, C. Évaluation du pouvoir immunogène du virus aphteux par mesure du pouvoir fixant le complément après traitement par un fluorocarbone. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, 261: 598-601, 1965.
28. SNEDECOR, G.W., COCHRAN, W.G. *Statistical methods*. 6<sup>a</sup> ed. Ames, Yowa State Univ., 1972. 593 p.
29. SUTMÖLLER, P., COTTRAL, G.E. Improved techniques for the detection of foot-and-mouth disease virus in carrier cattle. *Arch. ges. Virusforsch.*, 21: 170-177, 1967.
30. SUTMÖLLER, P., GOMES, I., ASTUDILLO, V. Estimación de potencia de vacunas contra la fiebre aftosa de acuerdo con los resultados de pruebas de anticuerpos. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 49-50: 27-30, 1984.
31. TESSLER, J. Reactivation of antibody-neutralized foot-and-mouth disease virus by organic chemicals and inhibition by 1-butanol. *Am. J. Vet. Res.*, 119: 917-922, 1966.

## TREATMENT OF VIRUS SUSPENSIONS WITH TRICHLOROTRIFLUORETHANE FOR THE PRODUCTION OF FOOT-AND-MOUTH DISEASE VACCINE ON AN INDUSTRIAL SCALE

G.C. DARSIE<sup>1</sup>, R.G. CUNHA<sup>2</sup>, I. GOMES<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pan-American Foot-and-Mouth Disease Center (PAHO/WHO)

P.O. Box 589, 20001-970 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>2</sup>Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense

Rua Vital Brazil Filho, 64, 24220 Niterói, RJ, Brazil

**Summary.** Suspensions of foot-and-mouth disease virus were treated on an industrial scale with 1% v/v of trichlorotrifluorethane (TTE) or chloroform to determine the viability of TTE as an alternative agent for the partial purification of vaccine antigens. The suspensions treated with chloroform showed an average reduction of 50.4% of the total protein content, while the suspensions treated with TTE showed a reduction of 33.4%. The vaccines formulated with the antigens treated with either of the two solvents did not present significant differences in the induction of immunity when assessed by the expected percentage of protection (EPP) of young cattle vaccinated for the first time. No disadvantages were noted in handling the TTE, nor were there any undesirable postvaccination reactions.

The foot-and-mouth disease (FMD) virus is a representative of the Picornaviridae family, whose seven serotypes compose the Aphthovirus genus. Its virion is formed of a simple ribonucleic acid chain coated by a lipid-free protein capsid (3) which renders it resistant to organic solvents like chloroform (26) and the fluorocarbons (16).

FMD vaccines, applied jointly with other measures, have been crucial in the fight to control the disease. The antigens are produced from *in vitro* cell cultures in which the virus replicates. Due to the lysogenic characteristic of its replication cycle, the virus, at the end of the culture, kills the cells releasing large amounts of cell proteins, lipids and other components into the medium, which if not removed, are incorporated as antigens into the

vaccine. For this reason, it is common practice to partially purify viral suspensions using 1% chloroform, by shaking or using a homogenizer, followed by clarification and filtration or continuous centrifugation (7).

Although efficacious, the use of chloroform poses a problem due to the turbidity of suspensions obtained from cell cultures that utilize bovine serum treated with polyethyleneglycol (PEG) (1); also undesirable is the wear it causes in equipment, the risks of accidents due to acute intoxication and the growing difficulties encountered in acquiring chloroform in some countries because of its illegal use as a drug purifier.

The search for a solvent to replace chloroform as a purifying agent in production of viral suspensions on an industrial scale revealed the possibility of using trichlorotrifluorethane (TTE). No references related to the stability of the antigens during storage were found, nor that of the oil-

---

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

adjuvanted vaccines produced with those antigens or about the possible occurrence of undesirable postvaccination reactions in cattle.

This study presents the results obtained in the comparison of TTE with chloroform, plus those related to the significant reduction of the concentration used.

## MATERIALS AND METHODS

Nine monovalent suspensions each of 300 liters of volume were prepared as part of the routine antigen production at the Vaccine Production Plant of The Pan American Foot-and-Mouth Disease Center. Five suspensions were O<sub>1</sub> Campos-Br/58 strain (OCAM); two were A<sub>24</sub> Cruzeiro-Br/55 strain (ACRU); one was A-79 Venceslau-Br/76 strain (AVEN); and one was C<sub>3</sub> Indaial-Br/71 strain (CIND).

BHK<sub>21</sub>C13 cells were cultivated in 120 to 600 litre tanks. Eagles medium containing 8% PEG-treated cattle serum, sterilized by filtration in a 0.22 µm cartridge (8) was used. After sedimentation of the cells, the virus growth medium was added. Those cultures intended for production in roller bottles were diluted to a concentration of 0.2 x 10<sup>6</sup> cell/ml in Eagles medium plus 8% of untreated serum, and the medium was drawn off after 72 hours of growth.

The cell cultures were inoculated with virus seeds at a rate of 0.02-0.06 infective viral particles per cell in serum-free Eagle medium containing a final concentration of 30% of 0.2M Tris-hydroxymethylaminomethane solution.

At the end of virus replication, the suspensions were chilled at 4 °C. Volumes of 10 liters were treated with 1% of chloroform using magnetic bar agitation in glass vessels for 30 minutes. The remainder was treated with 1% TTE using a closed circuit homogenizer, at 3500 rpm for one hour. After 18 hours of standing at 4 °C all of the supernatants were centrifuged at 7680 g.

Virus suspensions were inactivated with binary ethylenimine (6) at a final concentration of 3mM for 24 hours at 26 °C. The inactivant was hydrolyzed with 1M sodium thiosulfate just before the antigens were processed further.

During production the entire process was controlled by routine biological and physicochemical assays (14). In order to evaluate the efficiency of the treatments, the total protein content of some suspensions was determined prior to addition of the solvent and after clarification (9).

Eighteen paired vaccines were prepared with the nine monovalent antigens treated with TTE or chloroform, for tests of potency, innocuity, and antigenic stability after 300 days' storage at 4 °C. Volumes of two monovalent OCAM antigens and of two monovalent ACRU antigens were stored for 240 days at 4 °C and, after that period, eight pairs of vaccines were produced for potency testing.

All the vaccines were formulated with Freund's incomplete adjuvant (2,15) as per methodology described by Abaracón *et al* (2).

The influence of the treatments on immunogenicity was assessed by means of the expected percentage of protection (EPP) test, based on the indices of antibodies in the serum of primovaccinated cattle as determined by seroprotection in suckling mice or serum neutralization in cell culture (24,28).

All the results were analysed statistically by means of the Tukey test or by variance analysis with P > 0.05 (24, 28).

## RESULTS

This study presents the findings referring to the action of TTE as an agent for partial purification in comparison with chloroform. Table 1 presents the results regarding partial purification of the suspensions under study.

TABLE 1. Total protein content (mg/ml) in viral suspensions treated with 1% of trichlorotrifluoroethane (TTE) or chloroform (CLO).

Suspension	Total proteins (mg/ml)			% Reduction	
	Untreated	TTE	CLO	TTE	CLO
A	0,41	0,28	0,20	31,7	51,2
B	0,35	0,23	0,18	34,3	48,6
C	0,45	0,30	0,22	34,0	51,5

These values indicate that there was an average total protein content of 33.4% in the suspensions treated with TTE and 50.4% in those treated with chloroform; this difference is statistically significant.

Table 2 shows the results obtained with the 18 paired vaccines tested immediately following their production (0 DPP).

TABLE 2. Values of the lower limit of reliability of expected percentage of protection (EPP) achieved by the vaccines formulated with recently produced antigens (zero DPP), treated with trichlorotrifluoroethane (TTE) or chloroform (CLO).

Vaccines		EPP "ZERO" DPP	
		TTE	CLO
OCAM*	1599	78,7	87,5
OCAM	1602	91,3	93,0
OCAM	1605	85,0	84,6
OCAM	1606	89,6	86,8
OCAM	1607	96,1	95,6
ACRU	1613	83,2	88,4
ACRU	1622	96,4	94,6
AVEN	1604	84,3	90,8
CIND	1603	98,5	99,0

\*OCAM-O1 Campos-Br/58; ACRU-A24 Cruzeiro-Br/55; AVEN-A-79 Venceslau-Br/76; CIND-C3 Indaial-Br/71.

It can be seen that the immunogenic responses very slightly with the treatment but does not indicate a predominant influence of the treatments. The results shown in Table 3 for the eight vaccines stored at 4 °C for 300 days (300 DPP) show a similar relationship between the two treatments although there is an overall drop in immune response with respect to the data obtained with Zero DPP.

The results for the vaccines produced with the antigens stored at 4 °C for 240 days (240 DPP) also indicate a decline in the immune response (Table 4) with respect to zero DPP, although with less intensity than the results noted at 300 DPP.

The variance analysis applied to the results reveal significant differences in the EPPs found in the various times studied, as well as among the

TABLE 3. Values of the lower limit of reliability of expected percentage of protection (EPP) reached by vaccines stored at 4 °C for 300 days post-production (300 DPP), with antigens treated with trichlorotrifluoroethane (TTE) or chloroform (CLO).

Vaccines		EPP 300 DPP	
		TTE	CLO
OCAM*	1599	67,5	65,6
OCAM	1602	81,5	83,3
ACRU	1613	80,5	83,9
ACRU	1622	82,4	86,1

\*OCAM-O1 Campos-Br/58; ACRU-A24 Cruzeiro-Br/55.

strains utilized. There was no significant difference between the immune responses induced by the vaccines formulated with antigens treated with TTE or chloroform.

622 calves were vaccinated in the experiment and in no case were undesirable postvaccination reactions noticed.

In practice, it was noted that there was a reduction in the time required to sediment cell debris and that no turbidity occurred in the suspensions treated with TTE, as compared to those treated with chloroform. Nor were any disadvantages noticed with regard to their handling, such as toxic odors or damage to the equipment.

Table 4. Values of the lower limit of reliability of expected percentage of protection (EPP) reached by vaccines formulated with antigens treated with trichlorotrifluoroethane (TTE) or chloroform (CLO) and stored at 4 °C for 240 days post-production (240 DPP).

Vaccines		EPP 240 DPP	
		TTE	CLO
OCAM*	1599	77,8	89,0
OCAM	1602	79,1	79,9
ACRU	1613	80,4	80,9
ACRU	1622	90,0	83,0

\*OCAM-O1 Campos-Br/58; ACRU-A24 Cruzeiro-Br/55.

## DISCUSSION

This study found an average reduction of 33.4% of the protein content in FMD virus suspensions when they were treated with only 1% TTE in a single cycle. The bibliography consulted revealed information on the high degree of purification of viral suspensions which could be achieved, but by using up to 50% of chlorofluorocarbons (16), and a high number of cycles of solvent treatment and centrifugation (14). The excellent performance described can be attributed to the mixing process using a high potency homogenizer that provided better solvent dispersion and interaction. It should be noted that Manson *et al.* (23) obtained similar results in studies with poliovirus after two cycles at a proportion of 50%.

The use of liquid fluorocarbons in virus preparations began with Gessler (16), who purified smallpox and Rous sarcoma virus suspensions. Other procedures were developed to purify poliomyelitis virus, adenovirus and T5 coliphage (23), to eliminate anticomplementary factors of Coxsackie (18) and poliomyelitis viruses (20), and for the dissociation of complexes formed by poliomyelitis virus and antibodies (19).

TTE is a colorless, nonflammable, liquid chlorofluorocarbon, with a low degree of toxicity, utilized in the electronic industry as a cleaning agent for high-tech components. There are references about its use in the purification of FMD virus for electronic microscopic identification of viral particles (5), as well as in studies of complement fixation activity (25), the dissociation of virus-antibody complexes (29,31), purification for concentration by PEG (13), and for the production of vaccines of different types (4,10,14,21,22,27).

The TTE showed a single disadvantage in comparison with the treatment using chloroform, namely a reduction in the level of protein removal although this situation can be lessened or even reversed by using a greater proportion of TTE or a larger number of treatment cycles. With respect to the immune response induced by the vaccines tested, the results indicate that there was no diminution of the antigenic capacity of the suspensions treated with TTE as compared to those treated with chloro-

form. This confirms the findings of other authors (10,14,22,27), and reaffirms the possibility of TTE being used as an alternative in the industrial treatment of FMD virus suspensions.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to express their gratitude to Prof. Elizabeth B.B. Pereira, to Drs. Raúl Casas Olascoaga, Vicente M. Astudillo, Ubiratan Mendes Serrão and Alberto Knust Ramalho, for their generous assistance and cooperation.

This study was submitted to the Federal Rural University of Rio de Janeiro, Brazil, in partial fulfillment of the requirements for the degree of *Magister Scientiae* in Veterinary Pathology in the area of Preventive Veterinary Medicine.

## REFERENCES

1. ABARACON, D., GIACOMETTI, H. Vacunas contra la fiebre aftosa con virus producido en cultivos celulares con suero bovino tratado por polietilenglicol. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 21-22: 44-48, 1976.
2. ABARACON, D., MESQUITA, J.A., SALLUA, S., PEREZ RAMA, R. Emulsificante montanide 888 para la preparación de vacunas antiaftosa con adyuvante oleoso. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 45-46: 51-53, 1982.
3. ANDREWES, C.H. *Viruses of vertebrates*. 5<sup>a</sup> ed., London, 1989. p. 121-143.
4. AUGÉ DE MELLO, P., ASTUDILLO, V., GOMES, I., CAMPOS GARCIA, J.T. Aplicación en el campo de vacuna antiaftosa oleosa e inactivada: vacunación y revacunación de bovinos jóvenes. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 19-20: 31-37, 1975.
5. BACHRACH, H.L., BREESE, S.S. Purification and electron microscopy of foot-and-mouth disease virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 97: 659-665, 1958.
6. BAHNEMANN, H.G. Binary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production. *Arch. Virol.*, 47: 47-56, 1975.

7. BAHNEMANN, H.G., MESQUITA, J.A. Vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 53: 19-24, 1987.
8. BAHNEMANN, H.G., MESQUITA, J.A., ASTUDILLO, V., DORA, F. The production and application of an oil adjuvant vaccine against foot-and-mouth disease in cattle. In: *8th Meet. Europ. Soc. for Anim. Cell Technol. Modern Approaches to Animal Cell Technology*. Butterwoths, Butterworth e Co., 1987. p. 628-639.
9. BRADFORD, M.M. Rapid scientific methods for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248, 1976.
10. BROWN, F., CARTWRIGHT, B. Purification of the virus of foot-and-mouth disease by fluorocarbon treatment and its dissociation from neutralizing antibody. *J. Immunol.*, 85: 309-313, 1960.
11. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA. *Manual de procedimientos para el control de vacuna antiaftosa*. Rio de Janeiro, PANAFTOSA, 1980. 47 p. (Ser. Man. Técnicos, 2).
12. 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: 243-267, 1957.
13. FAYET, M.T. Concentration du virus de la fièvre aphteuse par le polyéthylène glycol. *Ann. Inst. Pasteur*, 118: 356-366, 1970.
14. FAYET, M.T., ROUMIANTZEFF, M., DUBOUCLARD, C., FONTAINE, J. Utilisation d'un fluorocarbène comme méthode d'étude du virus de la fièvre aphteuse. *Ann. Inst. Pasteur*, 109: 652-662, 1965.
15. FREUND, J., THOMPSON, K.M. A simple rapid technique of preparing water in oil emulsion of penicilin, drugs and biologicals. *Science*, 101: 468-469, 1945.
16. GESSLER, A.E. A new and rapid method for isolating viruses by selective fluorocarbon deproteinization. *Trans. N.Y. Acad. Sci.*, 18, Ser. II, (8): 701-703, 1956.
17. GOMES, I., ASTUDILLO, V. 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.
18. HAMPARIAN, V., MÜLLER, F., HUMMELER, K. Elimination of nonspecific components from viral antigens by fluorocarbon. *J. Immunol.*, 80: 468-475, 1958.
19. HUMMELER, K., KETLER, A. Dissociation of poliomyelitis virus from neutralizing antibody. *Virology*, 6: 297-299, 1958.
20. HUMMELER, K., HAMPARIAN, V. Removal of anticomplementary activity and host antigens from viral preparations by fluorocarbon. *Science*, 125: 547-548, 1957.
21. KLIMOV, N.M., MALAKHOV, A.G., GRIBANOV, V.N. Chemical purification of lapinized foot-and-mouth disease virus and trials of its antigenic and immunogenic properties. *Trudy Vsesoyus. Inst. Eksp. Vet.*, 24: 208-214, 1961.
22. MACKOWIAK, C., FONTAINE, J. Utilisation de virus traités au fluorocarbène pour la préparation du vaccin antiaphteux. In: *XVIII Congrès Mondial Vétérinaire*, Paris, 17-22 Jul. 1967. p. 383-386.
23. MANSON, L.A., ROTHSTEIN, E.L., RAKE, G.W. Purification of poliovirus with fluorocarbon. *Science*, 125: 546-547, 1957.
24. PIMEMTEL GOMES, F. *Curso de estatística experimental*. Piracicaba, SP, USP/ESALQ, 1971, 621 p.
25. POLATNICK, J. Studies on the small particle complement-fixing antigen of foot-and-mouth disease virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 103: 27-31, 1960.
26. PYL, G. Chloroform treatment of brain material infected with neurotropic viruses. *Exp. Vet. Med.*, 5: 1-5, 1951.
27. ROUMIANTZEFF, M., FONTAINE, J., DUBOUCLARD, C. Évaluation du pouvoir immunogène du virus aphteux par mesure du pouvoir fixant le complément après traitement par un fluorocarbène. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, 261: 598-601, 1965.
28. SNEDECOR, G.W., COCHRAN, W.G. *Statistical methods*. 6<sup>e</sup> ed. Ames, Yowa State Univ., 1972. 593 p.
29. SUTMÖLLER, P., COTTRAL, G.E. Improved techniques for the detection of foot-and-mouth disease virus in carrier cattle. *Arch. ges. Virusforsch.*, 21: 170-177, 1967.
30. SUTMÖLLER, P., GOMES, I., ASTUDILLO, V. Estimación de potencia de vacunas contra la fiebre aftosa de acuerdo con los resultados de pruebas de anticuerpos. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 49-50: 27-30, 1984.
31. TESSLER, J. Reactivation of antibody-neutralized foot-and-mouth disease virus by organic chemicals and inhibition by 1-butanol. *Am. J. Vet. Res.*, 119: 917-922, 1966.

## PRODUCCION DE VACUNA ANTIAFTOSA: FILTRABILIDAD DEL SUERO BOVINO TRATADO CON POLIETILENGLICOL Y SU EFECTO EN EL CRECIMIENTO CELULAR

J.L. REIS<sup>1</sup>, F.B. RANGEL FILHO<sup>2</sup>, A. ALONSO<sup>1</sup>, J.A. MESQUITA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS)  
Caixa Postal 589, 20001-970 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>2</sup>Instituto de Veterinaria, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Antiga Estrada Rio-São Paulo Km 47, 23851-970 Itaguaí, RJ, Brasil

**Resumen.** Se analizó el efecto del suero bovino con anticuerpos para el virus de la fiebre aftosa sin tratamiento y después de tratado con 2, 4, 6 y 8% de polietilenglicol (PEG), en el crecimiento de células BHK-21 Clon 13, cultivadas en suspensión. También se investigó la capacidad filtrante a través de membranas de 0,22  $\mu$ m del medio de crecimiento suplementado con suero de bovino previamente tratado con PEG. Se comprobó que el más bajo porcentaje de PEG que aún mantenía el crecimiento celular y una filtrabilidad de alto rendimiento era del 2%.

La línea de células fibroblásticas de riñón de hamster joven BHK-21 Clon 13, descrita por MacPherson y Stocker (9) adaptada a cultivos en suspensión (5), es la más utilizada para producir antígenos para la elaboración de vacunas contra la fiebre aftosa (FA) (11). El crecimiento de células *in vitro* requiere la presencia de determinantes macromoleculares, presentes en suero de animales (3). El suero de bovino posee factores de crecimiento necesarios para el crecimiento de cultivos de células BHK (12), y para que mantengan la susceptibilidad al virus de la FA. Por otra parte, el suero extraído de animales vivos puede vehiculizar agentes infecciosos y factores tóxicos que perjudican el crecimiento de los cultivos celulares, por lo que cada partida de suero debe ser adecuadamente controlada.

Warrington & Morgan (16) demostraron que el tratamiento del suero bovino con polietilenglicol (PEG) precipita selectivamente las proteínas

de alto peso molecular y los anticuerpos. Barteling (4) trató con 8% de PEG suero de bovinos vacunados varias veces con el virus de la FA para retirar los anticuerpos anti-FA, y observó que los medios de cultivo suplementados con el suero tratado, mantenían el efecto promotor del crecimiento de células BHK-21 Clon 13, en suspensión. El medio de crecimiento para cultivos celulares en monocapa conteniendo suero tratado con 8% PEG mantuvo su susceptibilidad frente al virus de la FA (1).

Usualmente, los laboratorios productores de vacuna antiaftosa ubicados en áreas endémicas de la enfermedad enfrentan dificultades relacionadas con la necesidad de esterilizar grandes volúmenes de medio de cultivo suplementado con suero bovino, a través de filtros tipo membrana que dan más seguridad y calidad al producto. Además, tienen el inconveniente de que los sueros de bovinos disponibles poseen altos niveles de anticuerpos anti-FA.

El presente trabajo tiene como objetivo determinar la proporción de PEG que resulte más adecuada para tratar el suero de bovinos vacunados con vacunas antiaftosa, permitiendo a la vez una

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



buena filtrabilidad en membranas de 0,22  $\mu\text{m}$ , sin comprometer el crecimiento de las células en botellas rolantes.

## MATERIALES Y METODOS

*Suero bovino:* El suero se obtuvo a partir de sangre colectada de bovinos en el momento de su sacrificio en el matadero (Bagé, Rio Grande do Sul, Brasil) por sección de la carótida. La sangre se recogió en recipientes esterilizados, con una solución de 100 UI de penicilina/ml y 0,15 mg de neomicina/ml. El coagulado después de cortado en pedazos pequeños se dejó en reposo durante 24 horas a 4°C en recipientes de plástico, perforados y colocados sobre otros para separar el suero. Los restos celulares y los residuos de los coágulos se separaron por centrifugación continua.

*Tratamiento del suero con PEG:* Alícuotas de 1000 ml de suero fueron adicionadas respectivamente de 2, 4, 6 y 8% de PEG (Polietilenglicol 8000 - Carbowax) disuelto en solución salina 0,15 M. La mezcla fue mantenida en agitación continua durante 60 min a 4°C, seguidamente se dejó decantar por otros 60 minutos a 4°C (4). A continuación, se retiró el sobrenadante y se filtró por membrana millipore 0,22  $\mu\text{m}$ . Posteriormente se midió el pH y la osmolaridad. El nivel de anticuerpos específicos para los virus de la FA, tipos O, A y C fue determinado por seroprotección en ratones lactantes (6) e inmunoelectroforesis (13).

*Medio de cultivo de células con suero:* Alícuotas de suero antes y después de tratado con PEG se incorporaron al medio de cultivo para pruebas de esterilidad y crecimiento celular. El medio de cultivo usado (MEM) para realizar el estudio descrito fue el mismo empleado en la rutina de la Planta Piloto de Producción de Vacuna del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (PANAFTOSA).

*Células BHK-21 Clon 13:* Se usaron células BHK-21 Clon 13 de bajo pasaje, adaptadas al cultivo en suspensión, y mantenidas en nitrógeno líquido, en volúmenes de 1 ml, a una concentración de  $5,0 \times 10^6$  cél/ml em medio MEM, conteniendo 20% de suero bovino inactivado y 10% de glicerol. Las células se descongelaron y cultivaron en balones

de vidrio de 2 litros, que contenían 1 litro de medio de crecimiento. Las células se incubaron a 37°C con agitación magnética, y se aerearon a través de filtros de algodón no absorbente para mantener el pH.

La capacidad de promover el crecimiento celular del suero se evaluó mediante la observación microscópica de su morfología. La viabilidad de las células se analizó en base a las curvas de crecimiento de cinco pasajes sucesivos, realizando recuentos a las 24 y 48 horas. El recuento inicial se ajustó para  $0,5 \times 10^6$  cél/ml.

## RESULTADOS

### *Filtrabilidad del suero tratado con PEG:*

El Cuadro 1 muestra los resultados de la filtrabilidad del suero y se observa que el suero tratado con 2% PEG filtró cinco veces más que el suero del mismo lote sin tratar. Los Cuadros 2 y 3 indican que no se observaron alteraciones de los valores de pH y osmolaridad respectivamente en el medio de cultivo suplementado con el suero antes y después de tratado. Los padrones de tonicidad del suero bovino fetal oscilan entre 260 y 340 m Osm/kg H<sub>2</sub>O.

El sistema de filtros de membranas 0,22  $\mu\text{m}$  tipo cartucho que se utiliza en la Planta Piloto de Producción de Vacuna de PANAFTOSA, permite filtrar alrededor de 200 litros de medio de cultivo suplementado con 8% de suero bovino íntegro, sin tratamiento. No obstante, se consigue filtrar hasta 1.500 litros de medio de cultivo que contiene la misma proporción de suero tratado con 2% de PEG (datos no publicados).

**Cuadro 1. Filtrabilidad (membrana 0,22  $\mu\text{m}$ ) del suero bovino antes y después de tratados con PEG.**

Tratamiento con PEG (%0)	Volumen filtrado (ml)
0	5
2	25
4	25
6	30
8	40

*Anticuerpos anti-FA:* Los niveles de anticuerpos determinados mediante las pruebas de seroprotección (Cuadro 4) e inmunoelectroforesis (Figura 1) en el suero tratado con 2% de PEG, comparados con los del suero del mismo lote antes y después de tratado con 8% de PEG revelan que el tratamiento con 2% de PEG no fue capaz de retirar anticuerpos.

*Capacidad promotora de crecimiento celular:* El Cuadro 5 muestra que los sueros tratados con PEG e incorporados al medio de cultivo, mantienen las características morfológicas de las células, sin perjudicar el crecimiento a lo largo de cinco pasajes.

**Cuadro 2. pH del suero y del medio de cultivo con suero antes y después de tratados con PEG.**

Tratamiento con PEG (%)	Suero	Medio con suero
0	7.2	7.52
2	7.3	7.52
4	7.4	7.52
6	7.4	7.52
8	7.7	7.52

## DISCUSION

El suero es comúnmente usado en cultivos celulares como elemento del medio de crecimiento. Es una mezcla compleja pero se reconocen algunas macromoléculas y su actividad. Por ejemplo, las albúminas controlan la biosíntesis celular, protegiendo la desintegración e inhibiendo la acción de las enzimas proteolíticas y las globulinas promueven el crecimiento celular, estimulando la síntesis del ADN, ARN y proteínas (8). Igualmente, los polipéptidos y las hormonas producen diversos efectos en las células, mientras que la insulina regula el consumo de glucosa y aminoácidos, pudiendo ser mitogénica. Por otra parte, la hidrocortisona actúa en la ligación y proliferación celular (7).

Los estudios sobre la filtrabilidad del suero tratado con diferentes porcentajes de PEG (Cuadro 1) demostraron que la menor cantidad capaz de

**Cuadro 3. Osmolaridad (m Osm/Kg H<sub>2</sub>O) del suero y del medio de cultivo con suero antes y después de tratados con PEG.**

Tratamiento con PEG (%)	Suero	Medio con suero
0	304	350
2	321	351
4	339	351
6	362	349
8	392	350

aumentar la filtrabilidad en comparación con la del mismo suero sin tratar fue el tratamiento con 2% de PEG. Por otra parte, los tratamientos con 4 y 6% de PEG no proporcionaron mejor rendimiento, mientras que este fue excelente como resultado del tratamiento con 8% de PEG. Sin embargo, este último puede causar problemas en la producción del virus de la FA, cuando se le incorpora en el medio para cultivar células BHK en botellas rolantes (14, 15). Por lo tanto, los laboratorios productores de vacuna antiaftosa podrán utilizar este método de tratamiento, disminuyendo la dificultad de esterilizar grandes volúmenes de medio de cultivo, suplementado con el suero bovino, a través de membranas 0,22 µm.

También se confirmó en el presente estudio que el suero tratado con 2% de PEG incorporado al medio de cultivo, fue capaz de mantener las características morfológicas y el crecimiento celular (Cuadro 4) al igual que el mismo suero tratado con 4, 6, 8% de PEG y el suero sin tratar.

**Cuadro 4. Índice de anticuerpos de un suero antes y después de tratado con PEG, por prueba de seroprotección.**

Tratamiento con PEG (%)	O <sub>1</sub> Campos	A <sub>24</sub> Cruzeiro	C <sub>3</sub> Indaial
0	4.40	1.25	3.60
2	3.60	1.75	2.36
8	0.10	0.10	0.86

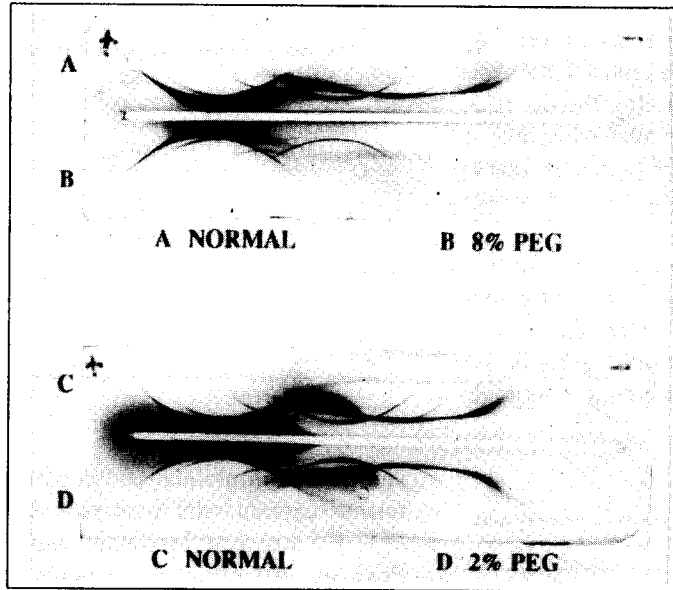


Figura 1. Inmunolectroforesis en gel de agar de sueros bovinos antes y después de tratados con PEG usando como antígeno suero total de conejo anti-IgG bovina (canaleta central). Las láminas muestran que hubo una reducción total de los niveles de anticuerpos detectables en el suero tratado con 8% PEG (B), mientras que en los sueros tratados con 2% PEG (D) y sin tratar (A y C) estos niveles permanecieron intactos.

El tratamiento del suero previo a su incorporación en el medio de cultivo usado en la rutina de producción del virus de la FA, por el método de cultivo celular en botellas rolantes, permitió obtener excelentes resultados del virus producido en la Planta Piloto. También se comprobó que el tratamiento con 2% de PEG no causaba problemas de adherencia celular en la superficie de las botellas, ni perjudicaba la replicación viral (datos no publicados).

Las pruebas de seroprotección (Cuadro 4) e inmunolectroforesis (Figura 1) indican que el tratamiento del suero con 2% PEG no fue capaz de retirar anticuerpos específicos a diferencia del suero del mismo lote tratado con 8% PEG. De ahí que esto imposibilite su uso en las pruebas de aislamiento de virus en cultivos celulares con fines diagnósticos (10). Se considera que la presencia de anticuerpos específicos debe ser la más baja posible para que éstos no interfieran en la infección celular neutralizando el virus. Aunque esto no debe ser un problema común, hay numerosas soluciones entre las cuales: el uso de medio libre de suero, la

inoculación con cantidad suficiente de virus para superar los anticuerpos existentes (2), y el uso de altas concentraciones de PEG para disminuir la cantidad de anticuerpos.

Se concluye que el tratamiento del suero con 2% PEG: (a) aumenta sensiblemente la filtrabilidad de los medios de cultivo celular en membranas 0,22  $\mu\text{m}$  que, por estar exentas de residuos tóxicos para

Cuadro 5. Crecimiento de células BHK-21 en suspensión en medio suplementado con suero antes y después de tratados con PEG.

% PEG	Recuento Final ( $\times 10^6$ cél/ml)									
	1		2		3		4		5	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
0	1.1	2.3	0.8	1.5	1.9	2.8	0.9	1.7	0.8	2.5
2	0.8	2.1	1.0	1.8	1.4	2.9	1.2	2.8	1.3	2.8
4	1.2	2.7	0.7	2.5	1.4	2.8	1.4	2.4	1.5	2.4
6	1.2	2.5	0.6	1.6	1.7	3.0	1.0	1.4	1.4	2.0
8	0.9	2.1	0.7	1.9	1.2	2.5	0.9	2.3	1.9	2.1

Ajustado recuento inicial para  $0,5 \times 10^6$  cél/ml a cada pasaje.

cultivo de células, permiten trabajar con seguridad y calidad; (b) mantiene la misma capacidad promotora de crecimiento celular que el suero sin tratar; (c) a pesar de no retirar anticuerpos específicos, no compromete la calidad del virus de la FA producido en botellas rolantes para la preparación de vacuna, como se observa con el tratado con 8% de PEG; (d) permite trabajar con grandes volúmenes de suero en ambiente aséptico y a baja temperatura, con lo que se evita el crecimiento bacteriano.

## RECONOCIMIENTOS

Este estudio forma parte de los requisitos para el título de *Magister Scientiae* en Microbiología Veterinaria de la Universidad Federal Rural de Rio de Janeiro.

Agradecimiento especial a los Drs. Raúl Casas Olascoaga, Vicente M. Astudillo y Ubiratan Mendes Serrão, y a todo el personal de la Planta Piloto.

## REFERENCIAS

1. ABARACON, D., GIACOMETTI, H. Vacunas contra la fiebre aftosa con virus producido en cultivos celulares con suero bovino tratado por polietilenglicol (PEG). *Bol. Cent. Panam. Fiebre Aftosa*, 21-22: 44-48, 1976.
2. BAHNEMANN, H.G., MESQUITA, J., ASTUDILLO, V., and DORA, J.F. The production and application of an oil adjuvant vaccine against foot-and-mouth disease in cattle. In: *European Society for Animal Cell Technology. Modern Approaches to Animal Cell Technology*. England, Butterworth & Co., 1987, p. 628-640.
3. BARAHONA, H.J., GAGGERO, A.C., and MESQUITA, J.A. *Manual de métodos de produção de vacina antiaftosa com adjuvante oleoso*. LARA/Campinas. Rio de Janeiro, PANAFTOSA, 1982, p. 103.
4. BARTELING, S.J. Use of polyethyleneglycol-treated serum for production of foot-and-mouth disease virus (FMDV) in growing BHK suspended cell cultures. *Bull. Off. int. Epiz.*, 81 (11-12): 1243-1254, 1974.
5. CAPSTICK, P.B., TELLING, R.C., CHAPMAN, W.G. Growth of a cloned strain of hamster kidney cells in suspended cultures and their susceptibility to the virus of foot-and-mouth disease. *Nature*, 195 (4847): 1163-1164, 1962.
6. 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., B. Aires*, 19 (110): 243-267, 1957.
7. FRESHMY, R.J. The culture environment substrate, gas phase, medium, and temperature. In: *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. New York, Alan R. Liss, 1987, p. 72-73.
8. LUSTIG, E.S. de, and NEBEL, A.E. *Cultivo de tejidos: un manual práctico*. Buenos Aires, Argentina, CEPANZO, 1981.
9. MAC PHERSON, I., and STOCKER, M. Polyoma transformation of hamster cell clones - an investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virol.*, 16: 147-151, 1962.
10. MESQUITA, J.A., and VIEIRA, A. Suero bovino tratado por PEG para uso en cultivos de células. *Bol. Cent. Panam. Fiebre Aftosa*, 63: 35-36, 1979.
11. MOWAT, G.N., and CHAPMAN, W.G. Growth of foot-and-mouth disease virus in a fibroblastic cell line derived from hamster kidneys. *Nature*, 194: 253-255, 1962.
12. OPS.PROASA. *Producción, control de calidad y uso de vacunas con adyuvante oleoso contra la fiebre aftosa*. Washington, D.C., OPS, 1987.
13. OUCHTERLONY, O., NILSSON, L.A. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In: Weir, D.M., Ed. *Handbook of experimental immunology*. 2 ed. Oxford. Blakwell v. 1, p. 19-1-19.28.
14. POLATNICK, J., and BACHRACH, H.L. Production and purification of milligram amounts of foot-and-mouth disease virus from baby hamster kidney cell cultures. *Appl. Microb.*, 12: 368-373, 1964.
15. UBERTINI, B., NARDELLI, L., DEL PRATO, A., PANINA, G., SANTERO, G. Large-scale cultivation of foot-and-mouth disease virus on calf kidney cell monolayers in rolling bottles. *Zentralbl. Veterin.*, 10:93-101, 1963.
16. WARRINGTON, R.E., and MORGAN, D.O. Foot-and-mouth disease virus in cattle and pigs: use of polyethylene glycol or dextrans for purifying 195 yM., immunoglobulin from sera. *Arch. ges. Virus*, 33: 134-144, 1971.

## PRODUCTION OF FOOT-AND-MOUTH VACCINE: FILTERABILITY OF CATTLE SERUM TREATED WITH POLYETHYLENEGLYCOL AND ITS EFFECT ON CELL GROWTH

J.L. REIS<sup>1</sup>, F.B. RANGEL FILHO<sup>2</sup>, A. ALONSO<sup>1</sup>, J.A. MESQUITA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pan American Foot-and-Mouth Disease Center (PAHO/WHO)  
P.O. Box 589, 20001-970 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>2</sup>Instituto de Veterinaria, Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Antiga Estrada Rio-São Paulo Km 47, 23851-970, Itaguaí, RJ, Brazil

**Summary.** The effect of cattle serum containing foot-and-mouth disease antibodies, on the growth of BHK-21 Clone 13 cells grown in suspension was studied before and after treatment with 2, 4, 6 and 8% polyethyleneglycol (PEG). The filtering capability of growth medium supplemented with cattle serum, previously treated with PEG, was also investigated with respect to passage through 0.22  $\mu\text{m}$  membranes. The optimum concentration of PEG was 2% for reasons of economy, high filterability and maintenance of cells.

The line of baby hamster kidney fibroblastic cells described by MacPherson and Stoker (9) adapted to suspension cultures (5) is the most utilized in producing antigens for the preparation of foot-and-mouth disease (FMD) vaccines (11). Cell growth *in vitro* requires a complex range of molecules some of which are present in animal sera (3). In the case of FMD antigen production, cattle serum is widely used in the growth of BHK cell cultures (12) and it is essential that such cultures maintain susceptibility to the FMD virus. Because the serum taken from live animals may be the vehicle for infectious agents and toxic factors that endanger the growth of cell cultures, every batch of serum should be adequately controlled.

Warrington and Morgan (16) demonstrated that the treatment of cattle serum with polyethyleneglycol (PEG) selectively precipitated the antibodies

and the high molecular weight proteins. Barteling (4) used 8% PEG to treat sera taken from cattle vaccinated several times with FMD virus to remove the anti-FMD antibodies, and observed that the culture media supplemented with the treated sera continued to promote the growth of BHK-21 Clone 13 cells in suspension. Monolayer cell cultures maintained in growth medium containing sera treated with 8% PEG retained susceptibility when challenged with FMD (1).

Commonly, FMD-vaccine-producing laboratories are located in areas where the disease is endemic and face difficulties related to their need to sterilize large volumes of culture medium supplemented with cattle serum, by means of membrane-type filters. Moreover, they have the drawback that the available cattle sera may contain high levels of FMD virus antibodies.

This study seeks to determine what proportion of PEG is most suitable to treat sera from cattle vaccinated with FMD vaccines with respect to filterability through 0.22  $\mu\text{m}$  membranes and cell growth in roller bottles.

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

## MATERIALS AND METHODS

*Bovine serum:* It was prepared from blood taken from cattle at the moment of slaughter in the abattoir (Bagé, Rio Grande do Sul, Brazil) by cutting the carotid artery. The blood was collected in sterilized containers holding a solution of 100 IU of penicillin/ml and 0.15 mg of neomycin/ml. The coagulated blood was later cut into small pieces and left to stand for 24 hours at 4°C in plastic containers. The serum was separated from cell debris and coagulated blood waste by continuous centrifugation.

*Treatment of the serum with PEG:* Aliquots of 1000 ml of serum were respectively mixed with 2, 4, 6 and 8% PEG (Polyethyleneglycol 8000 - Carbowax) dissolved in 0.15 M sterile saline solution. The mixture was agitated continuously for 60 minutes at 4°C, then immediately left to stand for another 60 minutes at 4°C (4). The supernatant was then removed and filtered through a 0.22 µm millipore membrane. Osmolarity and pH were subsequently measured. The level of specific antibodies in the treated sera for the O, A and C types of FMD was determined by the mouse protection test (6) and immunoelectrophoresis (13).

*Cell culture medium with serum:* Aliquots of serum before and after PEG treatment were blended with culture medium prior to sterility and cell growth tests. The culture medium used (MEM) to conduct the described study was the same as that used routinely at the Pan American Foot-and-Mouth Disease Center (PANAFTOSA) Vaccine Production Plant.

*BHK-21 Clone 13 cells:* The study used low passage BHK-21 Clone 13 cells adapted to suspension culture and maintained in liquid nitrogen in 1 ml volumes at a concentration of  $5.0 \times 10^6$  cell/ml in MEM medium containing 20% inactivated cattle serum and 10% glycerol. The cells were thawed and grown in 2-liter glass vessels containing 1 liter of growth medium. The cells were incubated at 37°C with magnetic stirring and were aerated by means of nonabsorbent cotton filters to maintain the pH.

The capacity to promote the cell growth of the serum was assessed by means of microscopic

observation of cell morphology and quantity. Analysis of cell viability was based on the growth curves of five successive passages and readings were taken at 24 and 48 hours intervals post-inoculation of the medium. The initial reading was adjusted to  $0.5 \times 10^6$  cell/ml.

## RESULTS

*Filterability of the serum treated with PEG:* Table 1 shows the results of the filterability of the serum. It is observed that the filtering of the serum treated with 2% PEG or more yielded five times more than the untreated serum of the same batch.

Tables 2 & 3 show that no changes in the pH or osmolarity values were recorded in the culture medium supplemented with the serum before and after PEG treatment. The tonicity standards of bovine fetal serum vary between 260 and 340 m Osm/kg H<sub>2</sub>O.

The cartridge type of 0.22 µm membrane filter system utilized at the PANAFTOSA Vaccine Production Plant permits filtering of about 200 liters of culture medium supplemented with 8% whole untreated cattle serum. However, up to 1500 liters of culture medium could be filtered when it contained the same amount of 2% PEG-treated serum (unpublished data).

*FMD antibodies:* The antibody levels determined from the mouse protection (Table 4) and immunoelectrophoresis (Fig. 1) tests on serum treated with 2% PEG were similar to those in untreated serum whereas treatment with 8% PEG removed most of the FMD specific antibody.

TABLE 1. Filterability (0.22 µm membrane) of cattle serum before and after PEG treatment.

Treatment with PEG (%)	Volumen filtered (ml)
0	5
2	25
4	25
6	30
8	40

**TABLE 2. pH of the serum and of the culture medium with serum before and after PEG treatment.**

Treatment with PEG (%)	Serum	Medium with serum
0	7.2	7.52
2	7.3	7.52
4	7.4	7.52
6	7.4	7.52
8	7.7	7.52

and inhibiting the action of proteolytic enzymes, and the globulins promote cell growth by stimulating the synthesis of DNA, RNA and proteins (8). Likewise, other polypeptides and hormones produce diverse effects on cells, while insulin regulates the consumption of glucose and amino acids, and may be mitogenic. Hydrocortisone acts on the binding and proliferation of cells (7).

Studies of the filterability of serum with varying percentages of PEG (Table 1) showed that the treatment with 2% PEG was the lowest quantity capable of increasing the filterability in comparison with untreated serum. On the other hand, treatments with 4 & 6% PEG did not provide greater yield, although an excellent yield resulted from treatment with 8% PEG. However, the latter treatment may cause problems in the production of FMD virus when it is incorporated into the medium for growth of BHK cell cultures in roller bottles (14, 15). Therefore, it follows that FMD vaccine production laboratories could utilize treatment of serum

**TABLE 3. Osmolarity (m Osm/kg H<sub>2</sub>O) of the serum and of the culture medium with serum before and after PEG treatment.**

Treatment with PEG (%)	Serum	Medium with serum
0	304	350
2	321	351
4	339	351
6	362	349
8	392	350

with 2% PEG, thereby lessening the difficulty of sterilizing large volumes of culture medium, supplemented with cattle serum, by passage through 0.22  $\mu$ m membranes.

This study also confirmed that the 2% PEG-treated serum, when incorporated into the culture medium, maintained the morphological characteristics and cell growth (Table 4) to the same extent as serum left untreated or treated with 4, 6 and 8% PEG.

Treatment of the serum prior to its blending with the cell medium used in the routine FMD-virus production led to excellent results for the virus produced at the Pilot Plant. It was also shown that 2% PEG treatment did not give problems of cell adherence on the surface of the bottles, nor did it appear to adversely affect viral replications (unpublished data).

The mouse protection (Table 4) and immunoelectrophoresis (Figure 1) tests indicate that treat-

**Table 4. Index of antibodies in a serum before and after PEG treatment, by mouse protection test.**

Treatment with PEG (%)	O <sub>1</sub> Campos	A <sub>24</sub> Cruzeiro	C <sub>3</sub> Indaial
0	4.40	1.25	3.60
2	3.60	1.75	2.36
8	0.10	0.10	0.86

*Capacity to promote cell growth:* Table 5 shows that sera treated with various concentrations of PEG and incorporated into the culture medium maintained cell viability without hampering cell growth throughout five passages.

## DISCUSSION

Serum is commonly used as a constituent of growth medium for cell cultures. It is a complex mixture but some of the macromolecules and their activities are recognized. For example, the albumins control cell biosynthesis, protecting against

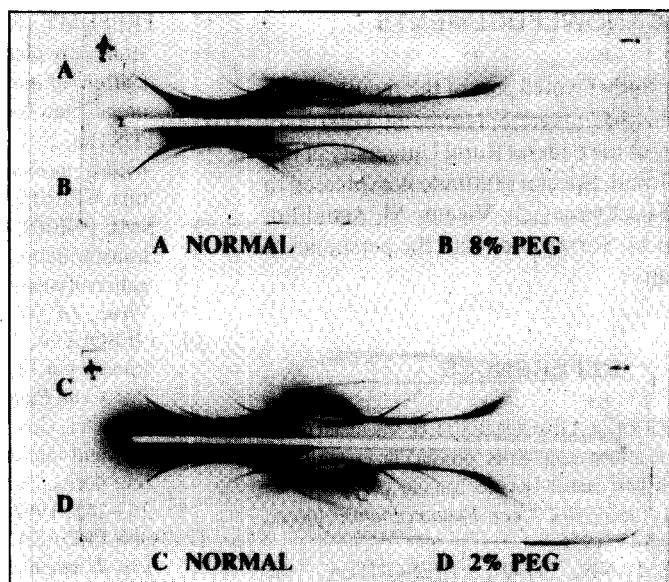


Figure 1. Immunoelectrophoresis in agar gels of cattle sera before and after PEG treatment using as antigen rabbit anti-bovine IgG (central lane). The slides show that there was a total reduction of the levels of detectable antibodies in the 8% PEG-treated serum (B), while in the 2% PEG-treated sera (D) the levels remained similar to those of untreated sera (A & C).

ing the serum with 2% PEG was not capable of removing specific antibodies as did occur with the serum from the same batch when treated with 8% PEG. This therefore precludes its use where cell culture virus is used for diagnostic purposes (10). It is believed that the presence of specific antibodies should be as low as possible so that they do not interfere with cell infection by prior neutralization of virus. While this may not be a common problem, there are a number of solutions including the use of serum-free medium, inoculation with sufficient virus to overcome existing antibody (2) and using high concentrations of PEG to at least minimize antibody content.

In general, it is concluded that treatment of serum with 2% PEG: (a) appreciably increases the filterability of medium through 0.22  $\mu\text{m}$  membranes; (b) maintain the same capacity to promote cell growth as the untreated serum; (c) although it does not necessarily remove significant quantities of specific antibodies, neither does it jeopardize

the quality of the FMD virus produced in roller bottles for vaccine production, contrary to the observation when 8% PEG is used; (d) enables larger volumes of serum to be handled in a low-temperature aseptic environment, thereby minimizing contamination of the subsequent medium.

Table 5. Growth of BHK-21 cells in suspension in medium supplemented with serum before and after PEG treatment.

Passages	Final Reading ( $\times 10^6$ cell/ml)									
	1		2		3		4		5	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
0	1.1	2.3	0.8	1.5	1.9	2.8	0.9	1.7	0.8	2.5
2	0.8	2.1	1.0	1.8	1.4	2.9	1.2	2.8	1.3	2.8
4	1.2	2.7	0.7	2.5	1.4	2.8	1.4	2.4	1.5	2.4
6	1.2	2.5	0.6	1.6	1.7	3.0	1.0	1.4	1.4	2.0
8	0.9	2.1	0.7	1.9	1.2	2.5	0.9	2.3	1.9	2.1

Initial reading adjusted for  $0.5 \times 10^6$  cell/ml at each passage.



## ACKNOWLEDGEMENTS

This study formed part of the requirements for the degree of *Magister Scientiae* in Veterinary Microbiology at the Federal Rural University of Rio de Janeiro, Brazil. Special gratitude is expressed to Drs. Raúl Casas Olascoaga, Vicente M. Astudillo, and Ubiratan M. Serrão and to all the personnel at the Pilot Plant.

## REFERENCES

1. ABARACON, D., GIACOMETTI, H. Vacunas contra la fiebre aftosa con virus producido en cultivos celulares con suero bovino tratado por polietilenglicol (PEG). *Bol. Cent. Panam. Fiebre Aftosa*, 21-22: 44-48, 1976.
2. BAHNEMANN, H.G., MESQUITA, J., ASTUDILLO, V., and DORA, J.F. The production and application of an oil adjuvant vaccine against foot-and-mouth disease in cattle. In: *European Society for Animal Cell Technology. Modern Approaches to Animal Cell Technology*. England, Butterworth & Co., 1987, p. 628-640.
3. BARAHONA, H.J., GAGGERO, A.C., and MESQUITA, J.A. *Manual de métodos de produção de vacina anti-aftosa com adjuvante oleoso*. LARAJ Campinas. Rio de Janeiro, PANAFITOSA, 1982, p. 103.
4. BARTELING, S.J. Use of polyethyleneglycol-treated serum for production of foot-and-mouth disease virus (FMDV) in growing BHK suspended cell cultures. *Bull. Off. int. Epiz.*, 81 (11-12): 1243-1254, 1974.
5. CAPSTICK, P.B., TELLING, R.C., CHAPMAN, W.G. Growth of a cloned strain of hamster kidney cells in suspended cultures and their susceptibility to the virus of foot-and-mouth disease. *Nature*, 195 (4847): 1163-1164, 1962.
6. 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., B. Aires*, 19 (110): 243-267, 1957.
7. FRESHMY, R.J. The culture environment substrate, gas phase, medium, and temperature. In: *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. New York, Alan R. Liss, 1987, p. 72-73.
8. LUSTIG, E.S. de, and NEBEL, A.E. *Cultivo de tejidos: un manual práctico*. Buenos Aires, Argentina, CEPANZO, 1981.
9. MAC PHERSON, I., and STOCKER, M. Polyoma transformation of hamster cell clones - an investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virology*, 16: 147-151, 1962.
10. MESQUITA, J.A., and VIEIRA, A. Suero bovino tratado por PEG para uso en cultivos de células. *Bol. Cent. Panam. Fiebre Aftosa*, 63: 35-36, 1979.
11. MOWAT, G.N., and CHAPMAN, W.G. Growth of foot-and-mouth disease virus in a fibroblastic cell line derived from hamster kidneys. *Nature*, 194: 253-255, 1962.
12. OPS.PROASA. *Producción, control de calidad y uso de vacunas con adyuvante oleoso contra la fiebre aftosa*. Washington, D.C., OPS, 1987.
13. OUCHTERLONY, O., NILSSON, L.A. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In: Weir, D.M., Ed. *Handbook of experimental immunology*. 2 ed. Oxford. Blackwell v. 1, p. 19-1-19.28.
14. POLATNICK, J., and BACHRACH, H.L. Production and purification of milligram amounts of foot-and-mouth disease virus from baby hamster kidney cell cultures. *Appl. Microb.*, 12: 368-373, 1964.
15. UBERTINI, B., NARDELLI, L., DEL PRATO, A., PANINA, G., SANTERO, G. Large-scale cultivation of foot-and-mouth disease virus on calf kidney cell monolayers in rolling bottles. *Zentralbl. Veterin.*, 10:93-101, 1963.
16. WARRINGTON, R.E., and MORGAN, D.O. Foot-and-mouth disease virus in cattle and pigs: use of polyethylene glycol or dextrans for purifying 195 yM., immunoglobulin from sera. *Arch. ges. Virus*, 33: 134-144, 1971.

## ANTICUERPOS MONOCLONALES ESPECIFICOS PARA HERPESVIRUS BOVINO TIPO-1 (CEPA COOPER)

M.T.C. WINKLER<sup>1\*</sup>, F.A. OSORIO<sup>2</sup>, M.S. SONDAHL<sup>2</sup>,  
F.B. RANGEL FILHO<sup>1</sup>, H. BARAHONA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Antiga Estrada Rio-São Paulo Km 47, 23851-970 Itaguaí, RJ, Brasil

<sup>2</sup>Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS)  
Caixa Postal 589, 20001-970 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

**Resumen.** Anticuerpos monoclonales fueron preparados contra herpesvirus bovino tipo 1 (BHV-1) purificado y se seleccionaron varios de acuerdo con su habilidad de neutralizar la infectividad viral. El virus fue purificado por dos métodos alternativos de concentración, con polietilenglicol seguido de ultracentrifugación sobre un colchón de sacarosa al 25% (p/p) o usando un gradiente lineal de tartrato de potasio. De un total de 204 líneas celulares que segregaban anticuerpos para el virus, obtenidas en dos fusiones, se seleccionaron y expandieron clonalmente 39 hibridomas. La selección se basó en su reactividad específica por ELISA. De éstos, 11 anticuerpos monoclonales fueron capaces de neutralizar BHV-1 total o parcialmente, con o sin el agregado de complemento. Siete anticuerpos monoclonales fueron producidos (en la forma de fluido ascítico) y purificados por precipitación en sulfato de amonio. De éstos, dos fueron capaces de prevenir la penetración del virión luego de su adherencia a las células. Asimismo, tres anticuerpos monoclonales fueron seleccionados para ser usados en las pruebas de inmunoperoxidasa para la detección del BHV-1 en cultivos celulares infectados.

El herpesvirus bovino-1 (BHV-1), que también es conocido como virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina, es un miembro de la subfamilia *Alphaherpesvirinal*, dentro de la familia *Herpesviridae*. El BHV-1 produce una variedad de síndromes del ganado bovino que incluyen: rinotraqueítis, conjuntivitis, vulvovaginitis pustular infecciosa, balanopostitis pustular infecciosa, abortos, enteritis y encefalitis (17). Al igual que otros herpesvirus, el BHV-1 puede causar infecciones que persisten por largo tiempo en forma latente en los ganglios nerviosos sensoriales y que pueden ser

reactivadas después de stress y tratamientos con corticoides (1,19). El BHV-1 codifica 22 polipeptidos no glicosilados estructurales y 11 polipeptidos glicosilados (5,30). Contiene tres grupos de glicoproteínas en su envoltura, a saber: la gI, que es una proteína heterodimérica, consistente de dos subunidades, una de 74/55 kDa, vinculada por un puente disulfuro a otra subunidad de 130 kDa, la gIII, una glicoproteína dimérica de 180/97 kDa, y la gIV, una glicoproteína dimérica de 150/77 kDa. Cada uno de estos grupos glicoproteicos induce anticuerpos neutralizantes específicos (11,28,31,39). La glicoproteína gI del BHV-1 puede actuar como una proteína de fusión (13), mientras que la gIII parece ser la proteína más importante para adherencia a la célula (27) y la gIV tendría un rol en la penetración viral a través de la membrana celular (9,37,39) y en fusión celular (39).

\* Dirección actual: Instituto Biológico de São Paulo  
Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252, 04014-002 São Paulo, SP, Brasil  
Solicitar separatas al:  
Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS)

El trabajo realizado consistió en la producción de anticuerpos monoclonales contra la cepa Cooper del BHV-1, la caracterización de las actividades biológicas de estos monoclonales, y su posterior uso en diagnóstico en las técnicas de ELISA, inmunoperoxidasa e inmunofluorescencia. También se compararon entre dos procedimientos alternativos de purificación viral usados para preparar antígeno para inmunización y obtención de hibridomas.

## MATERIALES Y METODOS

*Células y virus.* La cepa Cooper del BHV-1 se propagó en células renales bovinas Georgia (GBK) y el virus producido fue purificado en un gradiente de tartrato de potasio tal como fue descrito previamente (30). Alternativamente, el BHV-1 fue purificado por precipitación con polietilenglicol (PEG 6000) seguido de ultracentrifugación en un colchón de sacarosa de 25% (p/p) (comunicación personal del Dr. Brocchi, 1992, Istituto Zooprofilattico Sperimentale Della Lombardia e Dell'Emilia, Brescia, Italia).

*Electromicroscopia.* Las suspensiones de virus de cada purificación fueron colocadas en rejillas y teñidas por tinción negativa con ácido fosfotúngstico. Se sacaron electromicrografías usando un microscopio Zeiss EM 900 a una magnificación de 20000 X.

*Producción de anticuerpos monoclonales.* Ratones hembras BALB/c fueron inmunizados por vía intraperitoneal con cuatro inyecciones de 0,5 ml cada una de BHV-1 purificado. La primera inoculación (a una dosis de 100 µg por ratón) consistió de una suspensión virulenta del BHV-1 conteniendo  $10^{9.5}$  DICT<sub>50</sub>/ml en un volumen igual de adyuvante completo de Freund. Dos semanas más tarde, los ratones fueron reforzados con 50 µg del BHV-1 emulsificado con adyuvante de Freund incompleto. Este refuerzo fue repetido una semana más tarde y finalmente la última inyección consistió en 50 µg de BHV-1 en solución de salina buffer fosfato (PBS, pH 7,4). Luego de tres días de la última inyección o refuerzo, las células esplénicas de los ratones inmunizados fueron fusionadas con la línea celular de ratón SP-2/0, siguiendo los procedimientos descritos por Goding, 1983 (18) y

St. Groth & Scheidegger, 1980 (36), con algunas modificaciones. Los sobrenadantes de los hibridomas en crecimiento fueron investigados en su capacidad de producción de anticuerpos específicos para BHV-1, usando una ELISA indirecta y clonados por el método de dilución límite. Las correspondientes subclases de inmunoglobulina fueron determinadas por inmunodifusión doble. La selección de anticuerpos monoclonales a ser caracterizados posteriormente se basó en la reactividad por ELISA y en su habilidad en neutralizar el BHV-1 infeccioso, con o sin complemento de cobayo. Fluidos ascíticos fueron obtenidos por inoculación vía intraperitoneal de  $10^6$  a  $10^7$  células de hibridoma produciendo anticuerpos específicos en ratones BALB/c que habían sido sensibilizados alrededor de 7 a 10 días antes con pristane (2, 6, 10, 14-tetrametilpentadecano) o adyuvante completo de Freund (26,38).

*Purificación de anticuerpos.* Los fluidos de ascitis fueron diluidos, en una proporción de uno en cuatro, con PBS (pH 7,2) y mezclados con volúmenes equivalentes de sulfato de amonio saturado. Se permitió que se formara un precipitado a 4°C por 30 minutos antes de centrifugar y posteriormente siguió una diálisis en PBS (pH 7,2) (29). La eficiencia de diálisis fue comprobada usando el reactivo de Nessler para sulfatos (16).

## Pruebas de neutralización

*Pruebas de virus neutralización.* La actividad neutralizante de anticuerpos monoclonales fue investigada por titulación viral en presencia o no de una dosis fija de sobrenadante de hibridoma. La presencia de neutralización dependiente de complemento fue determinada por el agregado de suero de cobayo (2,5 % de concentración final). Una mezcla de sobrenadante de hibridoma y suspensión viral preincubada por 90 minutos a 37°C fue agregada a cada placa de 96 cavidades sembradas con células GBK. Las placas fueron incubadas a 37°C por tres días. La reducción de la actividad viral fue evaluada en base a una comparación de ambos títulos punto final 50% (con o sin complemento). Anticuerpos monoclonales fueron considerados neutralizantes cuando redujeron uno o más logaritmos de infectividad (12).

*Pruebas de reducción de placas.* La actividad neutralizante para BHV-1, presente en cultivos de células de hibridomas, fluidos ascíticos y anticuerpos monoclonales purificados por sulfato de amonio fueron ensayados usando una prueba de reducción de placas ejecutada en microplacas de 24 cavidades (3). Se agregó complemento de cobayo activo en algunos experimentos. Los anticuerpos monoclonales fueron considerados como "completamente neutralizantes", cuando se producía una reducción del 80% del número de placas y "parcialmente neutralizantes", cuando mostraban una reducción del número de placas de por lo menos 40% (15,33).

*Neutralización postadsorción.* Se usaron células GBK sembradas en placas de 24 cavidades que habían sido infectadas con una dosis que oscilaba entre 45 y 60 u.f.p. por cavidad del BHV-1 incubadas por un período de 2 horas a 4°C. Luego las células infectadas fueron lavadas una vez con PBS y anticuerpos monoclonales purificados por sulfato de amonio fueron agregados (sin diluir) por 2 horas a 4°C. Finalmente el anticuerpo monoclonal fue removido de esta incubación y reemplazado por medio MEM conteniendo 2% de suero fetal bovino. Las placas fueron incubadas a 37°C por 48 horas. Las monocamadas se fijaron con formol y fueron teñidas con cristal violeta. El anticuerpo monoclonal fue considerado como neutralizante cuando se observó una reducción del 50% de placas en relación al virus control (13,20).

#### Titulación de anticuerpos monoclonales

*Prueba de neutralización viral.* La prueba de neutralización viral fue llevada a cabo por el método de dilución de suero y virus fijo (6). Se usaron diluciones base 2 de fluidos ascíticos, sobrenadantes de hibridomas y anticuerpos monoclonales purificados por sulfato de amonio, comenzando en una dilución de 1:10 y fueron ensayados por duplicado para observar su habilidad de neutralizar 100 DICT<sub>50</sub> de BHV-1 en placas de microtitulación. Para algunos experimentos se usó el agregado de complemento activo de cobayo (3,29,33).

*ELISA.* El método usado fue una modificación de aquel descrito por Voller y colaboradores en 1976 (43). Titulaciones en bloques fueron

previamente llevadas a cabo a los efectos de determinar la dilución óptima de uso. Se colocó el BHV-1 purificado en microplacas de titulación de 96 cavidades, a una dilución de 1:200 en PBS (pH 7,4). Los anticuerpos monoclonales fueron agregados en diluciones base 10. Se usó como conjugado un antisuero de cabra contra IgG de ratón, conjugado con peroxidasa vegetal. Se consideró el título de ELISA como la recíproca de la dilución más alta del sobrenadante de hibridoma fluido ascítico o de monoclonales purificados con sulfato de amonio que lleva un mínimo de una lectura de 0,1 de unidad de absorbancia sobre el control usando un filtro de 492 nm (39). Se usó como control negativo un anticuerpo específico contra el virus de la fiebre aftosa.

*Pruebas de la inmunoperoxidasa.* Monocamadas GBK crecidas en láminas Lab-Tek fueron infectadas con 10<sup>7.75</sup> DICT<sub>50</sub>/ml de BHV-1. Cuando se observó efecto citopático, las células inoculadas se secaron al aire y fueron fijadas en acetona tamponada al 25% por 10 minutos. Los anticuerpos monoclonales purificados por sulfato de amonio se agregaron en diluciones base 5 en tampón de lavado (PBS 7,4; 0,05% Tween 20 y EDTA 1 mM) empezando en la dilución 1:1 para determinar la dilución óptima. Después de 45-60 minutos a 37°C las láminas fueron lavadas y se agregó un conjugado de peroxidasa proteína A. Las láminas fueron lavadas y se agregó el substrato (0,1 ul/ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 1,0 mg/ml de diaminobenzidina tetrahidroclorido). Después del lavado las láminas fueron teñidas por contraste con hematoxilina (diluida 1:5 en solución tampón de lavado) por 10 minutos. Las láminas fueron lavadas en agua corriente y examinadas con un microscopio de campo claro (2,32,35). Como controles negativos se usaron anticuerpos específicos contra el virus de la fiebre aftosa y camadas de células no infectadas. Como control positivo se usó un suero policlonal de ratón contra el BHV-1.

## RESULTADOS

*Herpesvirus bovino tipo 1.* El Cuadro 1 muestra los resultados de ambos métodos de purificación viral ensayados con un gradiente de tartrato de potasio seguido de concentración con

PEG, y por medio de centrifugación y/o ultracentrifugación en un colchón de sacarosa.

**Electromicroscopia.** El examen con electromicroscopio (Cuadro 1) confirmó que el virus obtenido por gradiente de tartrato de potasio estaba relativamente intacto. Ochenta por ciento de los viriones observados tenían envoltura completa y la preparación no presentaba contaminación visible con membranas celulares (Fig. 1). El virus obtenido por concentración con PEG y ultracentrifugación en un colchón de sacarosa (Fig. 2) reveló también poca contaminación con membranas celulares, pero la envoltura viral en este caso estaba considerablemente más dañada y solamente 20% de los viriones estaban completamente envueltos. Se encontraron partículas defectivas (vacías) en ambas purificaciones.

**Panel de anticuerpos monoclonales.** El análisis inicial por ELISA de los sobrenadantes obtenidos de los hibridomas reveló que existían 19 clones que reaccionaban con el BHV-1 concentrado por PEG (en el caso de fusión 60) y 187 purificados por tartrato de potasio (en la fusión 61). Diecinueve hibridomas fueron seleccionados y clonados a partir de la fusión 60 y veinte a partir de la fusión 61



FIGURA 1. Electromicrografía del BHV-1 purificado en un gradiente de tartrato de potasio (magnificación 2 x 104).

Winkler et al.

CUADRO 1. Purificación de herpes virus bovino-1.

	PEG gradiente de sacarosa	Gradiente de tartrato de potasio
Frasco de cultivo <sup>a</sup>	Roux 225 cm <sup>2</sup>	Roller 850 cm <sup>2</sup>
Título en células GBK <sup>b</sup> (DICT <sub>50</sub> /ml)	10 <sup>6.5</sup>	10 <sup>7.75</sup>
Volumen purificado (ml)	2000	200
BHV-1 purificado DICT <sub>50</sub> /ml)	10 <sup>8.0</sup>	10 <sup>9.5</sup>
Volumen final purificado (ml)	12	2.2
Concentración de proteína (mg/ml) <sup>c</sup>	2.4	2.0
Electromicroscopia <sup>d</sup>	20% virus entero 80% capsida	80% virus entero 20% capsida

<sup>a</sup> Frasco de cultivo usado en la producción del virus.

<sup>b</sup> Nivel de producción de virus en las células.

<sup>c</sup> Determinado para el ensayo de proteínas Bradford (Bio-rad).

<sup>d</sup> Electromicroscopia de transmisión (tinción negativa).

basados en los más altos valores en ELISA. Las pérdidas debido a la eficiencia de clonado fueron aproximadamente de 40% y se obtuvieron nueve monoclonales de la fusión 60, de los siguientes isotipos: seis IgG1, un IgG2a, un IgG2b y uno no determinado; y 14 en la fusión 61: cinco IgG1, tres IgG2a, dos IgG2b, un IgG3 y tres no determinados.

Finalmente, siete anticuerpos monoclonales (dos de la fusión 60 y cinco de la fusión 61) fueron seleccionados para una producción ulterior de fluido ascítico y purificación por sulfato de amonio basados en la actividad neutralizante de sobrenadantes (Cuadro 2). Todos ellos redujeron el título viral en uno o más logaritmos a través de los títulos de ELISA de selección inicial de sobrenadantes, fluidos ascíticos y anticuerpos monoclonales purificados por sulfato de amonio, los cuales están representados en la (Fig. 3). La actividad de anticuerpo monoclonal específico fue de 100 a 1000 veces más concentrada en los fluidos ascíticos y anticuerpos monoclonales purificados por sulfato de amonio que en los sobrena-

dantes. Dos anticuerpos monoclonales (61AF5A9 y 61BF2D8) pudieron neutralizar BHV-1 a un nivel de aproximadamente 50%, previniendo la penetración del virión en las células (postadsorción) en las pruebas de virusneutralización correspondientes. Al mismo tiempo redujeron el diámetro de placas. El análisis de estos dos anticuerpos monoclonales neutralizantes demostró que pertenecían a la subclase IgG2a. Los resultados obtenidos por neutralización viral, reducción de placas, neutralización postadsorción y ELISA están representados en el Cuadro 2.

*Detección por inmunoperoxidasa y anticuerpos BHV-1 en células infectadas.* El examen microscópico de células infectadas usando objetivos x10 y x25 reveló actividad de peroxidasa representada por unos depósitos granulosos marrón-rojizos en el citoplasma y núcleo usando anticuerpos moleculares (61AF5A9, 61BF2D8 y 61DH5E11, dilución 1/5) purificados en sulfato de amonio. Se usó un conjugado de peroxidasa de proteína A en 1/50. No se observó actividad inmunoperoxidasa en los controles negativos.

## DISCUSION

Los resultados de estos estudios sugieren que los varios monoclonales obtenidos son específicos para glicoproteínas basados en su actividad neutralizante (7,11,29,31,39,40). En general, tres glicoproteínas diferentes (gI, gIII y gIV) han sido identificadas en BHV-1 como los blancos principales de anticuerpos neutralizantes (11).

Dos anticuerpos monoclonales (61AF5A9 y 61BF2D8) redujeron el número total de placas en aproximadamente 50% del valor de control y también redujeron el tamaño de las placas en las pruebas de neutralización posteriores a la adsorción. Estos datos sugieren que estos anticuerpos monoclonales están dirigidos contra la gIV, y podrían interferir con el proceso de infección posterior a la adherencia

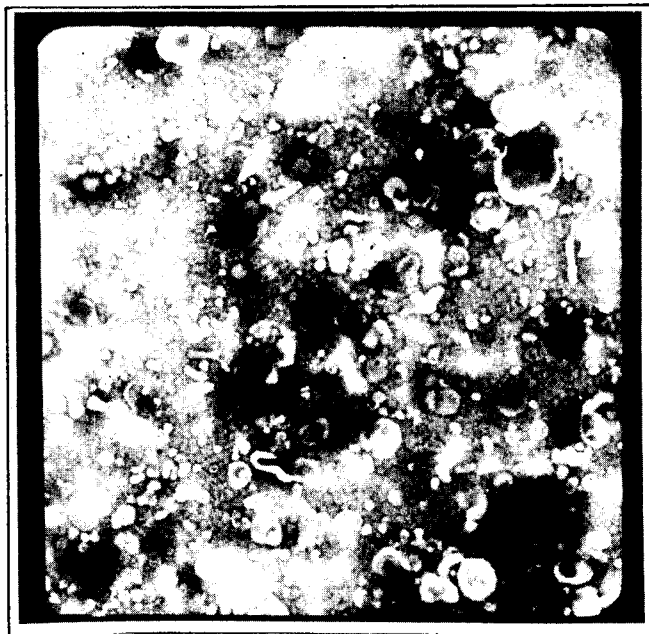


FIGURA 2. Electromicrografía del BHV-1 purificado en concentración de PEG y ultracentrifugación en un colchón de sacarosa (magnificación 2 x 104).

de virus y reducir el ensanchamiento de la placa (solamente anticuerpos contra la gIV generalmente inhiben el desarrollo de placas [13]). Estos mismos anticuerpos también presentaron títulos elevados en ELISA y virus-neutralización (33). La glicoproteína gIV cumple un rol importante en la penetración del virión a través de la membrana celular (9,37). Hay cinco áreas antigénicas en gIV que son reconocidas por anticuerpos que neutralizan el BHV-1. La adición de complemento redujo la concentración de anticuerpos necesaria para neutralizar el virus (28).

Los resultados obtenidos en las pruebas de neutralización con el tipo de monoclonales 60AB4H7, 60AG5E4, 61AE12F10, 61DF2H8 y 61DH5E11 sugieren que están dirigidos contra gI o gIII. La glicoproteína gIII es la más importante proteína de adherencia a la célula (27) y los anticuerpos monoclonales contra la gIII bloquean la adherencia de BHV-1. Cinco áreas antigénicas son reconocidas por anticuerpos dirigidos contra gIII. Cuatro de estas cinco fueron parcialmente neutralizadas antes en la ausencia de complemento y completamente neutralizadas en presencia del

**CUADRO 2. Características de siete anticuerpos monoclonales (AcM) producidos contra la cepa Cooper del herpes virus bovino-1. Ensayos hechos con sobrenadante de hibridomas, fluido ascítico y anticuerpos purificados por sulfato de amonio.**

AcM	Isoipo <sup>1</sup>	Reducción de placa <sup>2</sup>		Titulo neutralizante <sup>3</sup>			Neutralización después de adsorción*		Títulos ELISA <sup>4</sup>			
		Fluido ascítico GPC+	AcM purificado GPC-	Super-nadante GPC-	Fluido ascítico GPC-	AcM purificado GPC-	AcM Purificado GPC-	Sobre-nadante GPC+	Fluido Purificado ascítico	Purificado ascítico		
60AB4H7	IgG1	80%	80%	<10	<10	<10	80	No	No	2	3	4
60AG5E4	IgG2b	40%	80%	<10	<10	10	20	No	No	3	4	5
61AE12F10	IgG1	No	40%	<10	<10	<10	80	No	No	4	7	7
61AF5A9	IgG2a	80%	80%	<10	<10	20	320	50%+	50%+	4	6	6
61BF2D8	IgG2a	80%	80%	<10	20	180	320	50%+	50%+	4	7	6
61DF2H8	IgG3	80%	80%	<10	<10	<10	10	No	No	2	4	3
61DH5E11	IgG2b	80%	80%	<10	<10	10	160	No	No	4	7	6
							640	No	No	10	10	10

<sup>1</sup> Clase y subclase de Ig de ratón fue determinada por Ouchterlany de difusión doble.

<sup>2</sup> Resultados expresados como por ciento de reducción de placa relativo al control de virus. GPC indica complemento en cobayo. 80% indica neutralización completa, 40% = Neutralización parcial y No, no reaccionante.

<sup>3</sup> Títulos de virus-neutralización de sobrenadantes de hibridomas, fluidos ascíticos, anticuerpos monoclonales purificados en sulfato de amonio expresados como la recíproca de aquella dilución con un punto final de 50%.

<sup>4</sup> Expresado como la recíproca de la dilución más alta que dio un resultado de por lo menos 0,1.

\* Aumento de reducción de placa.

mismo. Solamente un área antigénica fue neutralizada por anticuerpos en ausencia de complemento (28).

Las glicoproteínas gI y gIV constituyen componentes esenciales del virión. La glicoproteína gI del BHV-1 es importante para la penetración del virión en las células y puede actuar como una proteína de fusión (14). Hay cuatro áreas antigénicas interrelacionadas en la glicoproteína gI. Tres áreas antigénicas fueron reconocidas por anticuerpos que neutralizaron el virus en la ausencia de complemento. Cuando el complemento estaba presente, una concentración más baja de anticuerpos fue necesaria para neutralizar BHV-1. La cuarta área neutralizante fue reconocida por anticuerpos parcialmente neutralizantes sin complemento y completamente neutralizantes en la presencia de complemento (29).

Las glicoproteínas especificadas por el herpesvirus son de particular interés dado que inducen anticuerpos neutralizantes. Cuando el BHV-1 fue purificado por ultracentrifugación en un gradiente de tartrato de potasio, se pudo confirmar por electromicroscopía la preservación de la integridad viral, particularmente la envoltura viral. El virus estaba intacto y la preparación estaba libre de proteínas celulares (Fig. 1). Se usaron gradientes de tartrato de potasio para purificar herpesvirus sin contaminación con proteínas celulares y daño mínimo a la envoltura viral (5, 8, 22, 30). Por otro lado, la purificación usando concentración con PEG y ultracentrifugación en un colchón de sacarosa alteró la integridad estructural de los viriones y se observaron pérdidas de envolturas virales (Fig. 2). Partículas incompletas pudieron ser encontradas cuando se usaron ambos protocolos de purificación. Estas partículas pueden ser contaminantes comunes de un stock viral o ser el resultado de pasajes seriados en cultivos celulares realizados a una alta multiplicidad de infección (10).

La titulación por ELISA de los sobrenadantes de cultivo celular de hibridomas, fluidos ascíticos y los anticuerpos monoclonales purificados por sulfato de amonio indicó que el nivel de anticuerpos monoclonales en fluidos ascíticos, y en los mismos fluidos ascíticos purificados por precipitación con sulfato de amonio, era de 10 a 1000 veces mayor que en los sobrenadantes de cultivos celulares de hibridomas (Fig. 3). Estos resultados están de acuerdo

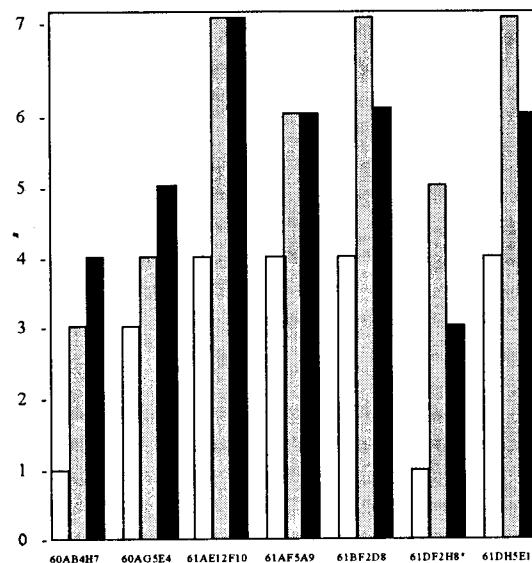


FIGURA 3. Titulación de anticuerpos moleculares por ELISA. Los títulos de ELISA fueron expresados como la recíproca de la dilución más elevada que dieron resultados de por lo menos 0,1 arriba del control en 492 nm. Las columnas blancas son los sobrenadantes, el sombreado claro los fluidos ascíticos y el oscuro, los anticuerpos monoclonales purificados con sulfato de amonio. \*Pérdidas en purificación.

con los resultados comunicados previamente (18,39).

La técnica de inmunoperoxidasa es tan sensible como la de inmunofluorescencia y aún más sensible que el aislamiento viral para detección de antígenos virales en tejidos fetales (35). Cuando se usa la inmunoperoxidasa con una coloración de contraste como hematoxilina, la técnica presenta la ventaja sobre la inmunofluorescencia de que permite reconocer características morfológicas de las células en estudio (34). Tres anticuerpos monoclonales purificados por sulfato de amonio (61AF5A9, 61BF2D8 y 61DH5E11) reaccionaron positivamente y con cultivos celulares infectados con el BHV-1 cuando se usaron en esta técnica. Por lo tanto, es posible que estos anticuerpos monoclonales puedan ser usados como reactivos en inmunoperoxidasa para diagnóstico rápido en infecciones por BHV-1.

Se han propuesto varios tipos de vacuna para controlar el BHV-1, las cuales incluyen: vacunas atenuadas TK negativas (23); vacunas de delección de gen gIII (24); vacunas recombinantes entre los



virus del BHV-1 y de la fiebre aftosa (25); vacunas inactivadas y de subunidades gI, gIII y gIV (4, 21, 41, 42). El panel de anticuerpos monoclonales que hemos preparado contra las glicoproteínas gI, gIII y gIV es importante desde el punto de vista de diagnóstico, así como también para su posible uso para diferenciación entre animales vacunados o animales infectados con BHV-1, especialmente en países que estén usando vacunas a subunidad o vacunas obtenidas por ingeniería genética que contengan una delección de ciertos marcadores serológicos.

La continuación de los estudios con estos monoclonales en el futuro podrían estar dirigidos a algunos de los siguientes puntos: (i) la caracterización por ensayo de inmunoprecipitación y/o por análisis de "Western blot" para identificar exactamente las glicoproteínas virales que reconocen; (ii) la caracterización por inmunoensayo de competición recíproca para identificar áreas antigénicas en las glicoproteínas; (iii) probar la reactividad con otros herpesvirus para estudiar la reactividad cruzada y además con cepas del BHV-1 de campo brasileñas a los efectos de asegurarse que estos aislamiento tienen una significación diagnóstica regional, y (iv) uso de estos monoclonales como una herramienta diagnóstica más sensible y específica en las técnicas de inmunoperoxidasa, inmunofluorescencia y ELISA.

### RECONOCIMIENTOS

Este trabajo fue financiado con un subsidio del Consejo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico, (CNPq) de Brasil, al autor principal, quien lo presentó como uno de los requerimientos para el grado de Master en Microbiología Veterinaria en la Universidad Federal Rural de Río de Janeiro. Agradecemos muy especialmente a la Sra. Luzia M. de Castro Cortes por la ayuda en la preparación y a la Dra. Ortrud Monika B. Schatzmayr por su contribución con electromicroscopía.

### REFERENCIAS

1. ACKERMANN, M., PETERHANS, E., WYLER R. DNA of bovine herpesvirus type 1 in the trigeminal ganglia of latently infected calves. *Amer. J. Vet. Res.*, 43:36-40, 1982.
2. ALLAN, G.M., MCNULTY, M.S., TODD, D., MCFERRAN, J.B. The rapid detection of Aujeszky's disease virus in pigs by direct immunoperoxidase labelling. *Vet. Microb.*, 10:481-486, 1985.
3. BABIUK, L.A., WARDLEY, R.C., ROUSE, B.T. Defense mechanisms against bovine herpesviruses: relationship of virus-host cell events to susceptibility to antibody-complement cell lysis. *Infect. Immun.*, 12:958-963, 1975.
4. BABIUK, L.A., LTTALIEN, J., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., ZAMB, T., LAW-MEN, M.J.P., HUGHES, G., GIFFORD, G.A. Protection of cattle from bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) infection by immunization with individual viral glycoproteins. *Virology*, 159:57-66, 1987.
5. BOLTON, D.C., ZEE, Y.C., ARDANS, A.A.. Identification of envelope and nucleocapsid proteins of infectious bovine rhinotracheitis virus by SDS-polyacrilamide gel electrophoresis. *Vet. Microb.*, 8:57-68, 1983.
6. CABREY, E.A. Recommended standard laboratory techniques for diagnosing infectious bovine rhinotracheitis, bovine diarrhea and shipping fever. *Proc. U.S. Anim. Health Assoc.*, 75:629-648, 1971.
7. CHANG, L.W.S., ZEE, Y.C., PRITCHETT, R.F. ARDANS, A.A. Neutralizing monoclonal antibodies directed to infectious bovine rhinotracheitis virus. *Arch. Virol.*, 88:203-215, 1986.
8. CHANTER, J.K., HUDSON, J.B. Proteins of murine cytomegalovirus: identification of structural and nonstructural antigens in infected cells. *Virology*, 86:22-36, 1978.
9. CHASE, C.C., CARTER-ALLEN, K., LOHFF, C., LETCHWORTH III, G.J. Bovine cells expressing bovine herpesvirus 1 (BHV-1) glycoprotein IV resist infection by BHV-1, herpes simplex virus, and pseudorabies virus. *J. Virol.*, 64: 4866-4872, 1990.
10. COLE, C.N., SMOLER, D., WIMMER, E., BALTIMORE, D. Defective interfering particles of poliovirus. I. Isolation and physical properties. *J. Virol.*, 7:478-485, 1971.
11. COLLINS, J.K., BUTCHER, A.C., RIEGEL, C.A., MCGRANE, V., BLAIR, C.D., TERAMOTO, Y.A., WINSTON, S. Neutralizing determinants defined by monoclonal antibodies on polypeptides specified by bovine herpesvirus 1. *J. Virol.*, 52:403-409, 1984.

12. CUNNINGHAM, C.H. *A laboratory guide in virology*. 6a ed. Burgess Publishing Company, 186p, 1964.
13. DUBUISSON, J., ISRAEL, B.A., LETCHWORTH III, G.J. Mechanisms of bovine herpesvirus type 1 neutralization by monoclonal antibodies to glycoproteins gI, gIII and gIV. *J. Gen Virol.*, 73:2031-2039, 1992.
14. FITZPATRICK, D.R., ZAMB, T., PARKER, M.D., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., BABIUK, L.A.. Expression of bovine herpesvirus 1 glycoprotein gI and gIII in transfected murine cells. *J. Virol.*, 62:4239-4248, 1988.
15. FRIENDLI, K. METZLER, A.E. Reactivity of monoclonal antibodies to proteins of a neurotropic bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strain and to proteins of representative BHV-1 strains. *Arch. Virol.*, 94:109-122, 1987.
16. GARVEY, J.S., CREMER, N.E., SUSSDORF, D.H. (1977). Exchange of solvent by dialysis or gel filtration. In: *Methods in Immunology*. 3rd ed. Benjamin, Reading, MA, 1977, p.55.
17. GIBBS, E.P.J., RWEYEMANU, M.M. Bovine herpesviruses, part I. Bovine herpesvirus 1. *Vet. Bull.*, 47:317-343, 17, 1977.
18. GODING, J.W. Antibody production by hybridomas. *J. Immunol. Meth.*, 39:285-308, 1980.
19. HOMAN, E.J., EASTERDAY, B.C. Experimental latent and recrudescer bovine herpesvirus-1 infections in calves. *Amer. J. Vet. Res.*, 44:309-313, 1983.
20. HUGHES, G., BABIUK, L.A., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S. Functional and topographical analyses of epitopes on bovine herpesvirus type 1 glycoprotein IV. *Arch. Virol.*, 103:47-60, 1988.
21. HUGHES, H.P.A., CAMPOS, M., GODSON, D.L., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., MCDUGALL, L., RAPIN, N., ZAMB, T., BABIUK, L.A. Immunopotential of bovine herpes virus subunit vaccination by interleukin-2. *Virology*, 74:461-466, 1991.
22. KIM, K.S., SUPLENZA, V.I., CARP, R.I., MOON, H.M. Analysis of the structural proteins of murine cytomegalovirus. *J. Virol.*, 17:906-915, 1976.
23. KIT, S., QAVI, H., GAINES, J.D., BILLINGSLY, P., MCCONNELL, S. Thymidine kinase-negative bovine herpesvirus type 1 mutant is stable and highly attenuated in calves. *Arch. Virol.*, 86:63-83, 1985.
24. KIT, S., OTSUKA, H., KIT, M. Gene-deleted IBRV marker vaccine. *Vet. Rec.*, 127:363-364, 1990.
25. KIT, S., KIT, M., DIMARCHI, R.D., LITTLE, S.P., GALE, C. Modified-live infectious bovine rhinotracheitis virus vaccine expressing monomer and dimer forms of foot-and-mouth disease capsid protein epitopes on surface of hybrid virus particles. *Arch. Virol.*, 120:1-17, 1991.
26. LETCHWORTH III, G.J., APPLETON, J.A. *Methods for production of monoclonal antibodies*. U.S Department of Agriculture. 1984. 63p. (Handbook N.630).
27. LIANG, X., BABIUK, L.A., VANDRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., FITZPATRICK, D.R., ZAMB, T.J. Bovine herpesvirus 1 attachment to permissive cells is mediated by its major glycoproteins gI, gIII and gIV. *J. Virol.*, 65:1124-1132, 1991.
28. MARSHALL, R.L., RODRIGUEZ, L.L., LETCHWORTH III, G.J. Characterization of the envelope proteins of infectious bovine rhinotracheitis virus (bovine herpesvirus 1) by biochemical and immunological methods. *J. Virol.*, 57:745-753, 1986.
29. MARSHALL, R.L., ISRAEL, B.A., LETCHWORTH III, G.J. Monoclonal antibody analysis of bovine herpesvirus-1 glycoprotein antigenic areas relevant to natural infection. *Virology*, 165:338-347, 1988.
30. MISRA, V., BLUMENTHAL, R.M., BABIUK, L.A. Proteins specified by bovine herpesvirus-1 (infectious bovine rhinotracheitis). *J. Virol.*, 40:367-378, 1981.
31. OKASAKI, K., HONDA, E., MINETOMA, T., KUMAGAI, T. Mechanisms of neutralization of monoclonal antibodies to different antigenic sites on the bovine herpesvirus type 1 glycoproteins. *Virology*, 150:260-264, 1986.
32. RODRIGUEZ, M., HEINLEIN, A.S., RUIZ, M., METZLER, A.E., SCHUDEL, A.A. Detection of bovine herpesvirus type 1 via an immunoperoxidase method, using monoclonal antibodies. *Amer. J. Vet. Res.*, 50:619-621, 1989.
33. SHEN, D.T., BURGER, D., LI, Z., GORHAM, R. Characterization of monoclonal antibodies to bovine herpesvirus type I, Los Angeles strain. *Vet. Microb.*, 28:25-37, 1991.
34. SINCLAIR, R.A., HARRIS, C.C. A short immunoperoxidase method. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 108:354, 1983.
35. SMITH, G.H., COLLINS, J.K., CARMAN, J. Use of an immunoperoxidase test for the detection of bovine herpesvirus-1 in aborted fetal tissue. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 1:39-44, 1989.
36. ST. GROTH, S.F., SHEIDEGGER, D. Production of monoclonal antibodies strategy and tactics. *J. Immunol. Meth.*, 35:1-21, 1980.

37. TIKOO, S.K., FITZPATRICK, D.R., BABIUK, L.A., ZAMB, T.J. Molecular cloning sequencing and expression of functional bovine herpesvirus glycoprotein gIV in transfected bovine cells. *J. Virol.*, 64:5132-5142, 1990.
38. TUNG, A.S., JU, S., SATO, S., NISONOFF, A. Production of large amounts of antibodies in individual mice. *J. Immunol.*, 116:676-681, 1976.
39. VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., VANDENHURK, J.V., GILCHRIST, J.E., MISRA, V., BABIUK, L.A. Interactions of monoclonal antibodies and bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) glycoproteins: characterization of their biochemical and immunological properties. *Virology*, 135:466-479, 1984.
40. VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., VAN DEN HURK, J.V., BABIUK, L.A. Topographical analysis of bovine herpesvirus type 1 glycoproteins: use of monoclonal antibodies to identify and characterize functional epitopes. *Virology*, 144:216-227, 1985.
41. VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., ZAMB, T., BABIUK, L.A. Synthesis, cellular location, and immunogenicity of bovine herpesvirus 1 glycoproteins gI and gIII expressed by recombinant vaccinia virus. *J. Virol.*, 63:2159-2168, 1989.
42. VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., PARKER, M.D., FITZPATRICK, D.R., ZAMB, T.J., VAN DEN HURK, J.V., CAMPOS, M., HARLAND, R., BABIUK, L.A. Expression of bovine herpesvirus 1 glycoprotein gIV by recombinant baculovirus and analysis of its immunogenic properties. *J. Virol.*, 65:263-271, 1991.
43. VOLLER, A., BIDWELL, D., BARTLETT, A. Microplate enzyme immunoassays for the immunodiagnosis of virus infections. In: N.B. Rose and H. Friedman (Editors). *Manual of clinical immunology*. Washington, Am. Soc. Microbiol., DC, pp. 506-512, 1976.

#### Anuncios

**Catálogo de Publicaciones, 1952-1993**  
 Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS)  
 Rio de Janeiro, Brasil, 1993

Este documento estará disponible en el primer semestre de 1994. Se trata de una compilación de las publicaciones hechas por el personal técnico de PANAF-TOSA.

El Comité Editorial recomienda a los autores que deseen publicar trabajos en esta revista la lectura de la Publicación Científica 526 de la OPS/OMS intitulada *Como escribir y publicar trabajos científicos* por Robert A. Day.

## MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST BOVINE HERPES VIRUS TYPE-1 (COOPER STRAIN)

M.T.C. WINKLER<sup>1\*</sup>, F.A. OSORIO<sup>2</sup>, M.S. SONDAHL<sup>2</sup>,  
F.B. RANGEL FILHO<sup>1</sup>, H. BARAHONA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Veterinaria, Universidad Federal Rural do Rio de Janeiro  
Antiga Estrada Rio-São Paulo Km 47, 23851-970 Itaguaí, RJ, Brasil

<sup>2</sup>Pan American Foot-Mouth Disease Center (PAHO/WHO)  
P.O. BOX 589, 20001-970 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

**Summary.** Monoclonal antibodies (McAbs) were prepared against purified Bovine Herpesvirus Type-(BHV-1) and selected for their ability to neutralize viral infectivity. Viral purification was performed by polyethylene glycol concentration and ultracentrifugation on a 25% (w/w) sucrose cushion, and by potassium tartrate linear gradient. Out of 204 cell lines expressing antibodies to the virus, obtained in two fusions, 39 hybridomas were selected and cloned based on enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reactivity. Eleven McAbs were able to neutralize BHV-1 partially or totally, with or without complement. Seven McAbs were produced as ascitic fluid, and ammonium sulfate-purified. Of these, two were able to prevent virion penetration into the cell after attachment. Three neutralizing McAbs were selected for use in immunoperoxidase tests for detecting BHV-1 in infected cell cultures.

BHV-1, which is also known as infectious bovine rhinotracheitis virus (IBRV) is an *Alphaherpesvirinae* of the family *Herpesviridae*. BHV-1 is responsible for a variety of diseases of cattle including rhinotracheitis, infectious conjunctivitis, pustular vulvovaginitis and balanoposthitis (IPV/IPB), abortions, enteritis and encephalitis (17). Like some other herpesviruses, BHV-1 can cause a long-term, latent infection in sensory ganglia and can be reactivated after stress or corticosteroid treatment (1,19). BHV-1 specifies 22 structural nonglycosylated polypeptides and 11 glycosylated polypeptides (5,30), and contains three major sets of envelope glycoproteins: gI, a 130-kDa disulfide-linked 74/55-kDa heterodimer, gIII,

a 180/97-kDa dimeric glycoprotein; and gIV, a 150/77-kDa dimeric glycoprotein, each of which induces the corresponding neutralizing antibodies (11,28,31,39). BHV-1 gI can act as a fusion protein (13), gIII appears to be the major attachment protein (27), and gIV is involved in virion penetration through the cell membrane (9,37,39) and cell fusion (39).

In this report we describe the production of monoclonal antibodies against BHV-1 Cooper strain, their biological activities and, further, their use as a diagnostic tool for ELISA, immunoperoxidase and immunofluorescence. Also a comparison is made of two types of viral purification procedures.

### MATERIALS AND METHODS

*Cells and Virus.* The Cooper strain of BHV-1 was propagated in Georgia bovine kidney (GBK) cells and purified on potassium tartrate gradient as described previously (30). Alternatively, BHV-1

\* Present address: Instituto Biológico de São Paulo  
Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252 04014-002 São Paulo, SP, Brasil  
Reprint requests to:  
Pan American Foot-and-Mouth Disease Center (PAHO/WHO)

was purified by precipitation with polyethylene glycol (PEG 6000) and ultracentrifugation on a 25% (w/w) sucrose cushion (personal communication Brocchi, 1992, Istituto Zooprofilattico Sperimentale Della Lombardia e Dell'Emilia, Brescia, Italia).

*Electron Microscopy.* Virus suspensions of each purification were placed on a grid and negatively stained with phosphotungstic acid. Electron micrographs were taken in a Zeiss EM 900 microscope at x 20000 magnification.

*Production of monoclonal antibodies.* Female BALB/c mice were immunized with four intraperitoneal injections of 0.5 ml purified BHV-1. The first inoculation (100 µg per mouse) was an emulsion of BHV-1 suspension containing  $10^{9.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml in an equal volume of Freund's complete adjuvant (FCA). Two weeks later the mice were boosted with 50 µg of BHV-1 emulsified with Freund's incomplete adjuvant. This booster was repeated one week later, and the last injection consisted of 50 µg per mouse of BHV-1 in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4). Three days following the last booster injection, the spleen cells from the immunized mice were fused with the murine cell line SP-2/0. The procedures of Goding, 1983 (18) and St. Groth & Scheidegger, 1980 (36) were adopted, with slight modifications. The supernatants of growing hybridomas were screened for production of BHV-1 specific antibodies by indirect ELISA and cloned by limiting dilution method. Immunoglobulin subclasses were determined by double diffusion. The selection of McAbs for characterization was based on ELISA reactivity and their ability to neutralize infectious BHV-1, with or without active guinea-pig complement. Ascitic fluids were obtained by intraperitoneal inoculation of  $10^6$  to  $10^7$  specific antibody-producing hybridoma cells into BALB/c mice that had been primed 7-10 days previously with pristane (2,6,10,14-tetramethylpentadecane) or FCA (26,38).

*Purification of antibodies.* Ascites fluids were diluted 1:4 with PBS (pH 7.2) and mixed with equal volumes of saturated ammonium sulfate. The precipitate was allowed to form at 4°C for 30 min before centrifugation and dialysis against PBS (pH

7.2) (29). The completion of dialysis was monitored by Nessler reactive for sulfate (16).

### Neutralization tests

*Virus neutralization test (VN).* The activity of McAbs was tested by viral titration in presence or not of a fixed dose of hybridoma supernatant. Complement-enhanced neutralization was determined by addition of guinea-pig serum at 2.5% (final concentration). A mixture of hybridoma supernatant and viral suspension preincubated for 90 min at 37°C was added to each 96-well plate seeded with GBK cells. The plates were incubated at 37°C for 3 days. Reduction of viral activity was evaluated comparing both titers 50%. McAbs were considered positive, when they reduced one or more logarithms of infectivity (12).

*Plaque reduction test (PRT).* BHV-1 neutralizing activity of hybridoma cell cultures, ascitic fluids and ammonium sulfate-purified McAbs were tested by a standard PRT assay in 24-well plates (3). Active guinea-pig complement was used in some experiments. McAbs were regarded as completely neutralizing when 80% reduction of plaques was obtained and partly neutralizing when showing a plaque reduction of at least 40% (15,33).

*Post-adsorption virus neutralization.* GBK cells growing in 24-well plates were infected with 45-60 p.f.u./well of BHV-1 and incubated for 2h at 4°C. Then, the infected cells were washed once with PBS and undiluted ammonium sulfate-purified McAbs were added for 2h at 4°C. Finally, the McAb was removed and minimal essential medium (MEM) containing 2% FBS was added. The plates were incubated at 37°C for 48h. The monolayers were fixed in formalin and stained with crystal violet. A McAb was considered neutralizing when 50% plaque reduction, relative to the virus control, was obtained (13,20).

### Titration of monoclonal antibodies

*Virus neutralization test.* Virus neutralization was carried out by the end-point dilution procedure (6). Two-fold dilutions of supernatants,

ascitic fluids and ammonium sulfate-purified McAbs, beginning at 1:10, were assayed in duplicate for the ability to neutralize 100 TCID<sub>50</sub> of BHV-1 in microtiter plates. In some experiments, active guinea-pig complement was added (3, 29, 33).

**ELISA.** The method used was a modification of Voller *et al.* (1976) to (43). Checkerboard titrations were performed previously to determine optimal dilution of purified BHV-1. Ninety-six well microtiter plates were coated with purified BHV-1 at a 1:200 dilution in PBS (pH 7.4). McAbs were added in 10-fold dilutions. HRPO-conjugated goat anti-mouse IgG was used as conjugate. The ELISA titer was determined as the reciprocal of the highest dilution of supernatant, ascitic fluid or ammonium sulfate-purified McAbs which gave a reading of at least 0.1 over the control in 492 nm filter (39). As negative control a McAb specific for foot-and-mouth disease virus was used.

**Immunoperoxidase test (IPT).** GBK monolayers, grown on Lab-tek slides were infected with 10<sup>7.75</sup> TCID<sub>50</sub>/ml of BHV-1. When cytopathic effect (CPE) was observed, the inoculated cells were air dried and fixed in 25% buffered acetone for 10 min. Ammonium sulfate-purified McAbs were added in 5-fold dilution in washing buffer (PBS 7.4, 0.05% Tween 20 and EDTA 1 mM) beginning at 1:1, to determine the optimal dilutions. After 45-60 min at 37°C the slides were washed and A-protein peroxidase conjugated added. The slides were washed and the substrate (0.1 ul/ml of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 1.0 mg/ml of diaminobenzidine tetrahydrochloride) was added. After washing, they were counterstained with Harri's hematoxylin (diluted 1:5 in wash buffer) for 10 min. The slides were washed in tap water and examined with a bright field microscope (2, 32, 35). McAb specific for foot-and-mouth disease virus and non-infected monolayers were used as negative controls, were used. A polyclonal mouse anti-BHV-1 serum was used as positive control.

## RESULTS

**Purification of BHV-1.** Table 1 shows the results of both methods of viral purification tested: with potassium tartrate gradient and concentration

TABLE 1. BHV-1 Purification.

	PEG and sucrose cushion	Potassium tartrate gradient
Bottles <sup>a</sup>	Roux 225 cm <sup>2</sup>	Roller 850 cm <sup>2</sup>
2*GBK titer <sup>b</sup> (TCID <sub>50</sub> /ml)	10 <sup>6.5</sup>	10 <sup>7.75</sup>
Volume purified (ml)	2000	200
HBV-1 purified titer TCID <sub>50</sub> /ml)	10 <sup>8.0</sup>	10 <sup>9.5</sup>
Final volume purified (ml)	12	2.2
Protein concentration <sup>c</sup> (mg/ml)	2.4	2.0
Electron Microscopy <sup>d</sup>	20% Whole virus 80% Capside	80% Whole virus 20% Capside

<sup>a</sup> Cell culture container used in viral production.

<sup>b</sup> Virus yield.

<sup>c</sup> Determined by the Bradford (Bio-Rad) protein assay.

<sup>d</sup> Transmission electron microscope (negative staining).

with PEG, and ultracentrifugation on a sucrose cushion.

**Electron Microscopy.** Electron microscopic examinations (Table 1) confirmed that the virus obtained by potassium tartrate gradient was relatively intact. Eighty percent of the observed virions were completely enveloped, and the preparation contained no visible contamination with cell membranes (Fig. 1). The virus obtained by concentration with PEG and ultracentrifugation on a sucrose cushion (Fig. 2) revealed little contamination with cell membranes, but the viral envelope was considerably damaged, and only 20% of the virions were completely enveloped. Defective particles were found in both purifications.

**Panel of monoclonal antibodies.** Initial screening by ELISA of the supernatants obtained from hybridomas revealed 19 clones that reacted with BHV-1 PEG concentrated (fusion 60) and 187 purified by potassium tartrate gradient (fusion 61). Nineteen were selected and cloned from fusion 60 and twenty from fusion 61 based on the highest results in ELISA. The losses on cloning efficiency were approximately 40%, resulting in nine McAbs from fusion 60: six IgG1, one IgG2a, one IgG2b and

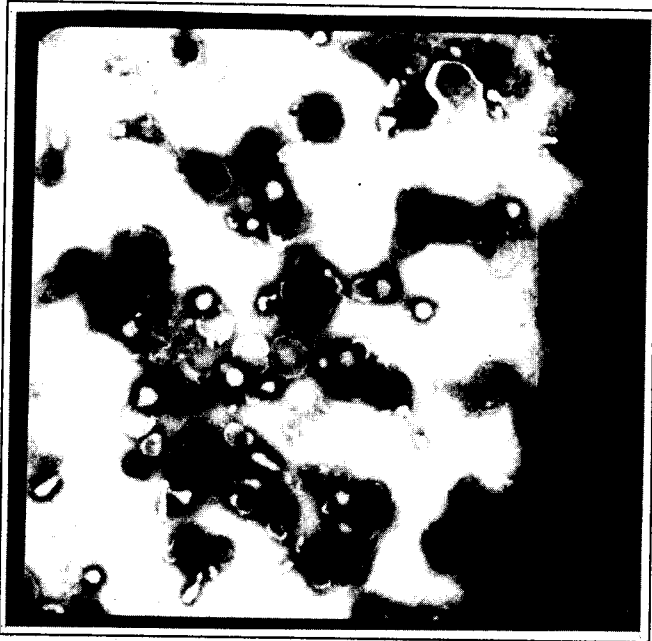


FIGURE 1. Electron micrograph of BHV-1 purified on potassium tartrate gradient (magnification: 2 x 104).

one not determined; and 14 from fusion 61: five IgG1, three IgG2a, two IgG2b, one IgG3 and three not determined.

Finally, seven McAbs (two from fusion 60 and five from fusion 61) were selected for further production of ascitic fluids and ammonium sulfate-purification based on supernatant neutralization activity (Table 2). All of them reduced the viral titer in one or more logarithms on initial screening. ELISA titers of supernatants, ascitic fluids and ammonium sulfate-purified McAbs are shown in Fig. 3. Ascitic fluids and ammonium sulfate-purified McAbs were 100 to 1000 fold higher than supernatants. Two McAbs (61AF5A9 and 61BF2D8) were able to neutralize BHV-1 in approximately 50%, preventing the virion penetration into the cell after attachment in post-adsorption VN tests, as well as reducing the plaque enlargement. Isotyping of these two neutralizing McAbs showed that they were of the IgG subclass 2a. Results obtained in VN, PRT, Post-adsorption VN, ELISA and isotypes are shown in Table 2.

*Immunoperoxidase detection of BHV-1 in infected cells by monoclonal antibodies.* Microscopic ex-

amination of infected cells using x10 and x25 objectives revealed peroxidase activity represented by red-brown granular deposits in the cytoplasm and nucleus using ammonium sulfate-purified McAbs 61AF5A9, 61BF2D8 and 61DH5E11 (all of them diluted 1/5). A-protein peroxidase conjugate was used 1/50. No immunoperoxidase activity was observed in negative controls.

## DISCUSSION

The results of this study suggest that the various McAbs obtained are specific for glycoproteins, based on their neutralizing activities (7, 11, 29, 31, 39, 40). In general three different BHV-1 glycoproteins (gI, gIII and gIV) have been identified as targets of neutralizing antibodies (11).

Two McAbs (61AF5A9 and 61BF2D8) reduced the total number of plaques in approximately 50% of the control value and also reduced plaque size in post-adsorption neutralization test. These data would suggest that these McAbs are directed against gIV. They could interfere with the infection process following attachment, and reduce the plaque enlargement (only antisera against gIV significantly inhibit plaque development [13]) and, they had, as well, high titers in ELISA and virus neutralization (33). Glycoprotein gIV is involved in virion penetration through the cell membrane (9, 37). There are five antigenic areas on gIV recognized by antibodies that neutralize BHV-1. In the presence of complement, a lower concentration of antibody was necessary to neutralize the virus (28).

Results obtained in neutralization tests with the McAbs 60AB4H7, 60AG5E4, 61AE12F10, 61DF2H8 and 61DH5E11 suggest that they react against gI or gIII. Glycoprotein gIII is the major attachment protein (27) and McAbs to gIII block BHV-1 attachment. Five antigenic areas were recognized by antibodies on gIII. Four of them showed partial neutralization in the absence of comple-

TABLE 2. Characteristics of seven monoclonal antibodies McAbs to BHV-1 Cooper strain using supernatant, ascitic fluid and ammonium sulfate purified antibodies.

McAb	Isotype <sup>1</sup>	Plaque reduction <sup>2</sup>		Neutralization titer <sup>3</sup>			Post-adsorption neutralization <sup>*</sup>		ELISA titers <sup>4</sup>			
		Ascitic fluid GPC+	Purified GPC-GPC+	Supernatant GPC-	Ascitic fluid GPC-	Purified GPC+	Purified GPC-	GPC+	Super-natant	Ascitic fluid	Purified	
60AB4H7	IgG1	80%	80%	<10	<10	<10	80	No	No	2	3	4
60AG5E4	IgG2b	40%	80%	<10	<10	20	10	No	No	3	4	5
61AE12F10	IgG1	No	40%	<10	<10	<10	80	No	No	4	7	7
61AF5A9	IgG2a	80%	80%	<10	<10	20	320	50%+	50%+	4	6	6
61BF2D8	IgG2a	80%	80%	<10	<10	20	320	50%+	50%+	4	7	6
61DF2H8	IgG3	80%	80%	<10	<10	<10	10	No	No	2	4	3
61DH5E11	IgG2b	80%	80%	<10	<10	10	160	No	No	4	7	6
		80%	80%	<10	<10	40	640	No	No	10	10	10

<sup>1</sup> Murine Ig class and subclass were determined by Ouchterlony double diffusion.

<sup>2</sup> Results expressed as per cent of PR relative to the virus control. GPC indicates guinea-pig complement.

80% indicates complete neutralization, 40% partly neutralizing and No, non reactive.

<sup>3</sup> VN titers of hybridoma supernatants, ascitic fluids, ammonium sulfate-purified McAbs expressed as reciprocal of that dilution giving a 50% end point.

<sup>4</sup> Expressed as the reciprocal of the highest dilution that still gave a reading of at least 0.1.

\* Reduction of plaque enlargement.



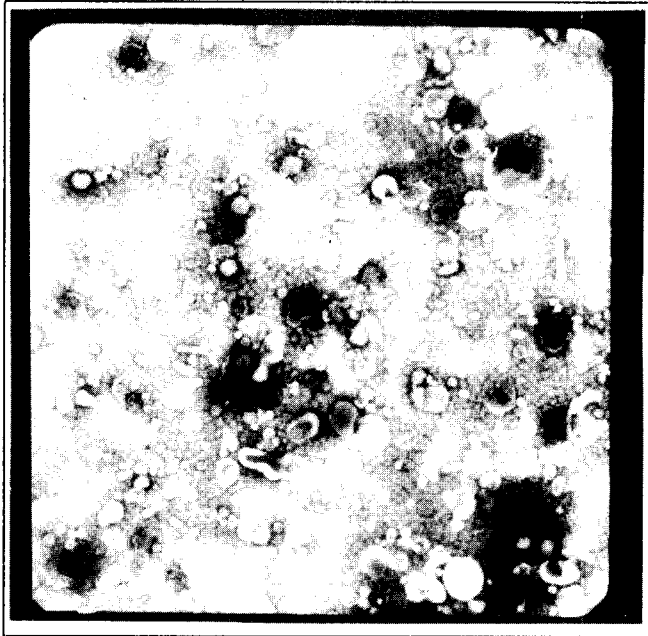


FIGURE 2. Electron micrograph of BHV-1 purified by PEG concentration and ultracentrifugation on a sucrose cushion (magnification:  $2 \times 104$ ).

ment, and completely in the presence of complement. Only one antigenic area was neutralized by antibodies in the absence of complement (28).

Glycoproteins gI and gIV constitute essential virion components. BHV-1 gI is important for virion penetration into cells and can act as a fusion protein (14). There are four interrelated antigenic areas on gI. Three of these areas were recognized by antibodies that neutralized the virus in the absence of complement. When complement was present, a lower concentration of antibody was required to neutralize BHV-1. The fourth antigenic area was recognized by antibodies which partially neutralized without complement, and completely neutralized in the presence of complement (29).

The glycoproteins specified by herpesviruses are of particular interest since they induce neutralizing antibodies. When the BHV-1 was purified by potassium tartrate gradient ultracentrifugation, the preservation of virion integrity, particularly the viral envelope, was confirmed by electron microscopy. The virus was intact and the preparation was free of host cell proteins (Fig 1). Potassium tartrate gradients have been used to purify herpesvirus

giving little contamination with host cell proteins and little damage of viral envelope (5,8,22,30). On the other hand, purification using PEG concentration and ultracentrifugation on a sucrose cushion resulted in disturbed structural integrity of virions, and viral envelope losses were observed (Fig 2). Defective particles were found in both purifications. These particles can be found as contaminants of a viral stock or obtained by serial passages at a high multiplicity of infection (10).

An ELISA titration of cell culture supernatants, ascitic fluids and ammonium sulfate-purified McAbs revealed that the level of McAbs in ascitic fluids and ammonium sulfate-purified ascitic fluids was 100 to 1000-fold higher than in cell culture hybridoma supernatants (Fig 3). These data are in agreement with the results obtained previously (18,39).

The immunoperoxidase technique is as sensitive as immunofluorescence and more

sensitive than virus isolation for detection of viral

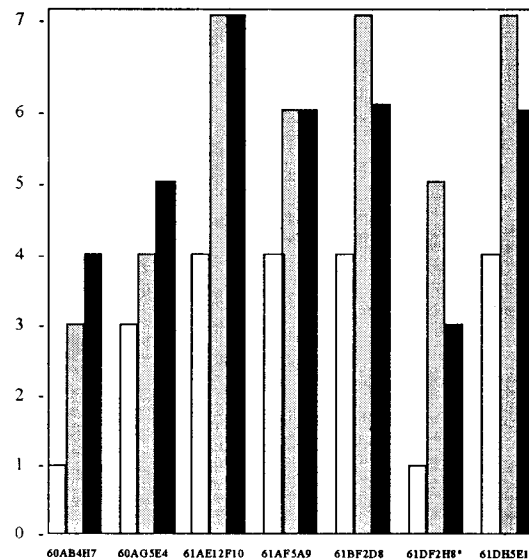


FIGURE 3. Titration of McAbs in ELISA. The ELISA titers were expressed as the reciprocal of the highest dilution that still gave a reading of at least 0.1 over the control in 492 nm. Blank column is supernatants, light shading is ascitic fluids and dark shading, ammonium sulfate-purified McAbs. \* Losses on purification.

antigens in fetal tissues (35). When used with hematoxylin counterstain, IPT techniques have an advantage over immunofluorescence techniques because morphologic features of cells can be studied (34). Three ammonium sulfate-purified McAbs (61AF5A9, 61BF2D8 and 61DH5E11) were tested positively with infected BHV-1 cell cultures. Thus, it is suggested that these McAbs can be used as reagents in immunoperoxidase for rapid diagnosis.

Modified-live TK-negative (23), gIII gene-deleted (24), recombinant IBRV-foot-and-mouth disease virus (25); inactivated and subunit vaccines, gI, gIII and gIV have been developed (4,21,41,42) to control BHV-1. The panel of McAbs prepared against gI, gIII and gIV in this study is important for producing diagnostic reagents and for further use as a possible tool to distinguish between BHV-1 infected and immunized animals in countries using subunit or genetically engineered deletion marker vaccines.

Further studies on these McAbs could focus on the following points: (i) Characterization by immunoprecipitation assay and/or by "Western" blot analysis to unequivocally identify viral glycoproteins; (ii) Characterization by reciprocal competition immunoassay to identify antigenic areas on the glycoproteins; (iii) Reactivity with other Herpesviruses to study cross-reactions, and with Brazilian BHV-1 field isolates to ensure regional diagnostic coverage of these isolates, and (iv) Use of these McAbs as a more specific and sensitive diagnostic tool in Immunoperoxidase, Immunofluorescence and ELISA tests.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by a grant from The National Council of Scientific and Technological Development (CNPq), of Brazil, to the senior author, who presented it in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Veterinary Microbiology at the Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Special thanks are given to Ms. Luzia M. de Castro Cortes for the grid assembly and Dra. Ortrud Monika B. Schatzmayr for the electron microscopy.

#### REFERENCES

1. ACKERMANN, M., PETERHANS, E., WYLER R. DNA of bovine herpesvirus type 1 in the trigeminal ganglia of latently infected calves. *Amer. J. Vet. Res.*, 43:36-40, 1982.
2. ALLAN, G.M., MCNULTY, M.S., TODD, D., MCFERRAN, J.B. The rapid detection of Aujeszky's disease virus in pigs by direct immunoperoxidase labelling. *Vet. Microb.*, 10:481-486, 1985.
3. BABIUK, L.A., WARDLEY, R.C., ROUSE, B.T. Defense mechanisms against bovine herpesviruses: relationship of virus-host cell events to susceptibility to antibody-complement cell lysis. *Infect. Immun.*, 12:958-963, 1975
4. BABIUK, L.A., LITALIEN, J., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., ZAMB, T., LAW-MEN, M.J.P., HUGHES, G., GIFFORD, G.A. Protection of cattle from bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) infection by immunization with individual viral glycoproteins. *Virology*, 159:57-66, 1987.
5. BOLTON, D.C., ZEE, Y.C., ARDANS, A.A.. Identification of envelope and nucleocapsid proteins of infectious bovine rhinotracheitis virus by SDS-polyacrilamide gel electrophoresis. *Vet. Microb.*, 8:57-68, 1983.
6. CABREY, E.A. Recommended standard laboratory techniques for diagnosing infectious bovine rhinotracheitis, bovine diarrhea and shipping fever. *Proc. U.S. Anim. Health Assoc.*, 75:629-648, 1971.
7. CHANG, L.W.S., ZEE, Y.C., PRITCHETT, R.F. ARDANS, A.A. Neutralizing monoclonal antibodies directed to infectious bovine rhinotracheitis virus. *Arch. Virol.*, 88:203-215, 1986.
8. CHANTER, J.K., HUDSON, J.B. Proteins of murine cytomegalovirus: identification of structural and nonstructural antigens in infected cells. *Virology*, 86:22-36, 1978.
9. CHASE, C.C., CARTER-ALLEN, K., LOHFF, C., LETCHWORTH III, G.J. Bovine cells expressing bovine herpesvirus 1 (BHV-1) glycoprotein IV resist infection by BHV-1, herpes simplex virus, and pseudorabies virus. *J. Virol.*, 64: 4866-4872, 1990.
10. COLE, C.N., SMOLER, D., WIMMER, E., BALTIMORE, D. Defective interfering particles of poliovirus. I. Isolation and physical properties. *J. Virol.*, 7:478-485, 1971.

11. COLLINS, J.K., BUTCHER, A.C., RIEGEL, C.A., MCGRANE, V., BLAIR, C.D., TERAMOTO, Y.A., WINSTON, S. Neutralizing determinants defined by monoclonal antibodies on polypeptides specified by bovine herpesvirus 1. *J. Virol.*, 52:403-409, 1984.
12. CUNNINGHAM, C.H. *A laboratory guide in virology*. 6a ed. Burgess Publishing Company, 186p, 1964.
13. DUBUISSON, J., ISRAEL, B.A., LETCHWORTH III, G.J. Mechanisms of bovine herpesvirus type 1 neutralization by monoclonal antibodies to glycoproteins gI, gIII and gIV. *J. Gen Virol.*, 73:2031-2039, 1992.
14. FITZPATRICK, D.R., ZAMB, T., PARKER, M.D., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., BABIUK, L.A.. Expression of bovine herpesvirus 1 glycoprotein gI and gIII in transfected murine cells. *J. Virol.*, 62:4239-4248, 1988.
15. FRIENDLI, K. METZLER, A.E. Reactivity of monoclonal antibodies to proteins of a neurotropic bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strain and to proteins of representative BHV-1 strains. *Arch. Virol.*, 94:109-122, 1987.
16. GARVEY, J.S., CREMER, N.E., SUSSDORF, D.H. (1977). Exchange of solvent by dialysis or gel filtration. In: *Methods in Immunology*. 3rd ed. Benjamin, Reading, MA, 1977, p.55.
17. GIBBS, E.P.J., RWEYEMANU, M.M. Bovine herpesviruses, part I. Bovine herpesvirus 1. *Vet. Bull.*, 47:317-343, 17, 1977.
18. GODING, J.W. Antibody production by hybridomas. *J. Immunol. Meth.*, 39:285-308, 1980.
19. HOMAN, E.J., EASTERDAY, B.C. Experimental latent and recrudescence bovine herpesvirus-1 infections in calves. *Amer. J. Vet. Res.*, 44:309-313, 1983.
20. HUGHES, G., BABIUK, L.A., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S. Functional and topographical analyses of epitopes on bovine herpesvirus type 1 glycoprotein IV. *Arch. Virol.*, 103:47-60, 1988.
21. HUGHES, H.P.A., CAMPOS, M., GODSON, D.L., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., MCDUGALL, L., RAPIN, N., ZAMB, T., BABIUK, L.A. Immunopotential of bovine herpes virus subunit vaccination by interleukin-2. *Virology*, 74:461-466, 1991.
22. KIM, K.S., SUPIENZA, V.I., CARP, R.I., MOON, H.M. Analysis of the structural proteins of murine cytomegalovirus. *J. Virol.*, 17:906-915, 1976.
23. KIT, S., QAVI, H., GAINES, J.D., BILLINGSLEY, P., MCCONNELL, S. Thymidine kinase-negative bovine herpesvirus type 1 mutant is stable and highly attenuated in calves. *Arch. Virol.*, 86:63-83, 1985.
24. KIT, S., OTSUKA, H., KIT, M. Gene-deleted IBRV marker vaccine. *Vet. Rec.*, 127:363-364, 1990.
25. KIT, S., KIT, M., DIMARCHI, R.D., LITTLE, S.P., GALE, C. Modified-live infectious bovine rhinotracheitis virus vaccine expressing monomer and dimer forms of foot-and-mouth disease capsid protein epitopes on surface of hybrid virus particles. *Arch. Virol.*, 120:1-17, 1991.
26. LETCHWORTH III, G.J., APPLETON, J.A. *Methods for production of monoclonal antibodies*. U.S Department of Agriculture. 1984. 63p. (Handbook N.630).
27. LIANG, X., BABIUK, L.A., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., FITZPATRICK, D.R., ZAMB, T.J. Bovine herpesvirus 1 attachment to permissive cells is mediated by its major glycoproteins gI, gIII and gIV. *J. Virol.*, 65:1124-1132, 1991.
28. MARSHALL, R.L., RODRIGUEZ, L.L., LETCHWORTH III, G.J. Characterization of the envelope proteins of infectious bovine rhinotracheitis virus (bovine herpesvirus 1) by biochemical and immunological methods. *J. Virol.*, 57:745-753, 1986.
29. MARSHALL, R.L., ISRAEL, B.A., LETCHWORTH III, G.J. Monoclonal antibody analysis of bovine herpesvirus-1 glycoprotein antigenic areas relevant to natural infection. *Virology*, 165:338-347, 1988.
30. MISRA, V., BLUMENTHAL, R.M., BABIUK, L.A. Proteins specified by bovine herpesvirus-1 (infectious bovine rhinotracheitis). *J. Virol.*, 40:367-378, 1981.
31. OKASAKI, K., HONDA, E., MINETOMA, T., KUMAGAI, T. Mechanisms of neutralization of monoclonal antibodies to different antigenic sites on the bovine herpesvirus type 1 glycoproteins. *Virology*, 150:260-264, 1986.
32. RODRIGUEZ, M., HEINLEIN, A.S., RUIZ, M., METZLER, A.E., SCHUDEL, A.A. Detection of bovine herpesvirus type 1 via an immunoperoxidase method, using monoclonal antibodies. *Amer. J. Vet. Res.*, 50:619-621, 1989.
33. SHEN, D.T., BURGER, D., LI, Z., GORHAM, R. Characterization of monoclonal antibodies to bovine herpesvirus type I, Los Angeles strain. *Vet. Microb.*, 28:25-37, 1991.
34. SINCLAIR, R.A., HARRIS, C.C. A short immunoperoxidase method. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 108:354, 1983.

35. SMITH, G.H., COLLINS, J.K., CARMAN, J. Use of an immunoperoxidase test for the detection of bovine herpesvirus-1 in aborted fetal tissue. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 1:39-44, 1989.
36. ST. GROTH, S.F., SHEIDEGGER, D. Production of monoclonal antibodies strategy and tactics. *J. Immunol. Meth.*, 35:1-21, 1980.
37. TIKOO, S.K., FITZPATRICK, D.R., BABIUK, L.A., ZAMB, T.J. Molecular cloning sequencing and expression of functional bovine herpesvirus glycoprotein gIV in transfected bovine cells. *J. Virol.*, 64:5132-5142, 1990.
38. TUNG, A.S., JU, S., SATO, S., NISONOFF, A. Production of large amounts of antibodies in individual mice. *J. Immunol.*, 116:676-681, 1976.
39. VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., VANDENHURK, J.V., GILCHRIST, J.E., MISRA, V., BABIUK, L.A. Interactions of monoclonal antibodies and bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) glycoproteins: characterization of their biochemical and immunological properties. *Virology*, 135:466-479, 1984.
40. VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., VAN DEN HURK, J.V., BABIUK, L.A. Topographical analysis of bovine herpesvirus type 1 glycoproteins: use of monoclonal antibodies to identify and characterize functional epitopes. *Virology*, 144:216-227, 1985.
41. VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., ZAMB, T., BABIUK, L.A. Synthesis, cellular location, and immunogenicity of bovine herpesvirus 1 glycoproteins gI and gIII expressed by recombinant vaccinia virus. *J. Virol.*, 63:2159-2168, 1989.
42. VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., PARKER, M.D., FITZPATRICK, D.R., ZAMB, T.J., VAN DEN HURK, J.V., CAMPOS, M., HARLAND, R., BABIUK, L.A. Expression of bovine herpesvirus 1 glycoprotein gIV by recombinant baculovirus and analysis of its immunogenic properties. *J. Virol.*, 65:263-271, 1991.
43. VOLLER, A., BIDWELL, D., BARTLETT, A. Microplate enzyme immunoassays for the immunodiagnosis of virus infections. In: N.B. Rose and H. Friedman (Editors). *Manual of clinical immunology*. Washington, Am. Soc. Microbiol., DC, pp. 506-512, 1976.

#### Announcements

**Catalogue of publications, 1952-1993**  
Pan American Foot-and-Mouth Disease Center (PAHO/WHO)  
Rio de Janeiro, Brasil, 1993

This document will be available in the first semester of 1994. It is a compilation of scientific papers published by the staff of PANAFTOSA.

The Editorial Committee recommends authors wishing to publish articles in the *Boletín* the reading of references such as *How to write and Publish a Scientific Paper* by Robert A. Day. The Oryx Press, Phoenix, AZ, USA.

## PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA ANTIGENOS GRUPO ESPECIFICOS DEL VIRUS DE LA LENGUA AZUL

M.M. KANASHIRO<sup>1</sup>, E.C. CONTREIRAS<sup>1</sup>, A. ALONSO<sup>2</sup>, H. BARAHONA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Veterinaria, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro,  
Antiga Estrada Rio-São Paulo, Km 47 23851-970 Itaguaí, RJ, Brasil

<sup>2</sup>Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS)  
Caixa Postal 589, 20001-970 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

**Resumen.** Se desarrollaron anticuerpos monoclonales contra el antígeno grupo específico del virus de la lengua azul serotipo 4. Los hibridomas se obtuvieron a partir de células de bazo de ratones BALB/c inmunizados, fusionadas con células de mieloma Sp2/O-Ag14, usando polietilenglicol 1500 y clonados por dilución limitante. El sobrenadante de ocho anticuerpos monoclonales se probó, por inmunodifusión en gel de agar, contra antígenos grupo específicos procedentes de cuatro laboratorios diferentes. Todos mostraron una buena reacción con el antígeno grupo específico. Por lo tanto, estos anticuerpos monoclonales tienen gran potencial para ser usados en la identificación de anticuerpos grupo específicos mediante la prueba ELISA de competición.

La lengua azul (LA) es una enfermedad viral que afecta principalmente a los ovinos y otros rumiantes domésticos y salvajes. Se encuentra ampliamente distribuida en Africa, América, Australia, el Medio Oriente y el sudeste de Asia, y es transmitida por insectos hematófagos. Los mosquitos del género *Culicoides* son sus principales vectores (14).

El virus de la lengua azul (VLA) pertenece a la familia *Reoviridae*, género *Orbivirus* en el que han sido reconocidos actualmente 24 serotipos por pruebas de virusneutralización (4). El genoma viral está constituido por 10 segmentos de ARN de doble cadena, cada uno de los cuales codifica por lo menos un polipeptido viral. De las siete proteínas que componen la partícula viral de doble capa, cinco (P1, P3, P4, P6 y P7) forman el núcleo. Una capa proteica difusa, compuesta por las P2 y P5 (15), envuelve externamente el núcleo.

Hasta el presente las funciones de las proteínas no estructurales NS1, NS1a, NS2, NS3 y NS3a, identificadas en células infectadas con VLA, no han sido aclaradas (13).

El polipeptido P2, principal antígeno serotipo específico del VLA, es responsable por la neutralización viral. Junto con la P5, son las proteínas de mayor variabilidad entre los serotipos del VLA (13, 15).

Una de las principales proteínas grupo específicas del VLA es el polipeptido P7. Esta es más conservada, altamente hidrofóbica, puede presentarse en forma de polímeros y posee por lo menos dos epítopes en la superficie externa de la partícula viral (4, 9, 10, 11).

El diagnóstico serológico de LA se realiza principalmente mediante la prueba de inmunodifusión en gel de agar (IDGA). Esta, a pesar de ser simple y práctica, tiene una baja sensibilidad, presenta reacciones cruzadas con otras orbivirosis y su interpretación es subjetiva (1). Por otro lado, la prueba de enzimoimmunoensayo (ELISA) competitiva empleando anticuerpos monoclonales presenta

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

una mayor sensibilidad y especificidad para la detección de anticuerpos contra LA, y no revela reacciones cruzadas con otras orbivirosis (3). Sobre esta base, la FAO/IAEA ha sugerido a la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) la padronización internacional de esta prueba de ELISA para la detección de anticuerpos grupo específicos contra LA (5).

El presente trabajo tiene como objetivo la producción de anticuerpos monoclonales contra un antígeno grupo específico (AGE) a partir del serotipo 4 del VLA y su caracterización parcial frente a los AGE empleados en el diagnóstico serológico de LA por IDGA.

Se emplearon ratones BALB/c machos de 6 a 8 semanas de edad inmunizados con el VLA serotipo 4 (8). El inóculo consistió en  $10^{4,09}$  DL<sub>50</sub>/ml de un segundo pasaje en cerebro de ratón lactante, en un volumen de 0,3 ml por vía intraperitoneal a intervalos de 10 días. El primer inóculo consistió en partes iguales de una suspensión viral y adyuvante completo de Freund. En la segunda y tercera inoculación se empleó una suspensión viral en adyuvante incompleto de Freund, también en partes iguales. Para la cuarta y quinta inoculación, se utilizó solamente la suspensión viral.

Dos ratones fueron sacrificados con CO<sub>2</sub> a los tres días de la última inoculación y los bazo extirpados asépticamente. Estos se lavaron y maceraron en medio Dulbecco modificado (DMEM). Posteriormente, el macerado se trató con tampón ACK (NH<sub>4</sub>CL 0,15 M; KHCO<sub>3</sub> 0,01M; Na<sub>2</sub> EDTA 2 H<sub>2</sub>O 0,01 M) durante un minuto en baño de hielo y luego se neutralizó con 40 ml de DMEM, conteniendo 5% de suero fetal bovino y 5 UI/ml de heparina. La suspensión se centrifugó a 1000 g por 12 minutos a 4°C. El sedimento se resuspendió en medio DMEM para realizar el recuento de linfocitos.

Paralelamente, células de mieloma Sp2/O-Ag14 (16) en fase logarítmica de crecimiento, se lavaron con medio DMEM, manteniendo una relación de mieloma-linfocito 1:4. Las células de mieloma y los linfocitos se fusionaron mediante la adición de 1 ml de

polietilenglicol (PM 1500) por cada 180 millones de células, según la metodología descrita por Galfré y Milstein (6,7), modificada por el laboratorio de anticuerpos monoclonales del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (PANAFTOSA).

Luego de la fusión, las células se cultivaron en medio de crecimiento selectivo (DMEM, 4 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio) con 2% de HAT y 15% de suero fetal bovino. La selección de los hibridomas positivos se realizó a través de la prueba de ELISA indirecta, en la cual la fase sólida contenía el AGE del VLA. Este AGE se obtuvo a partir del sobrenadante de cultivo en monocapa de células BHK-21 inoculadas con VLA, según la metodología descrita por Allende *et al.* (2).

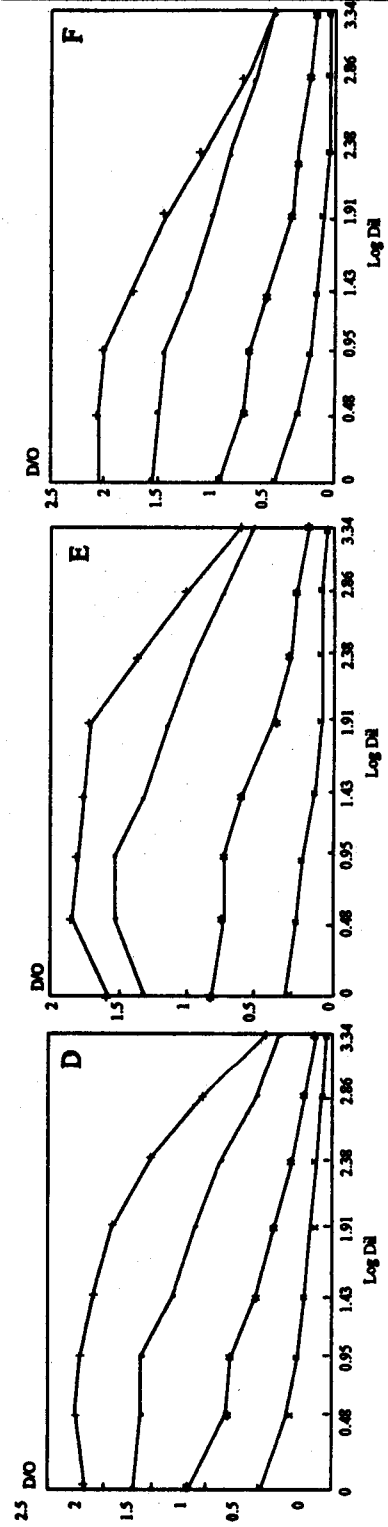
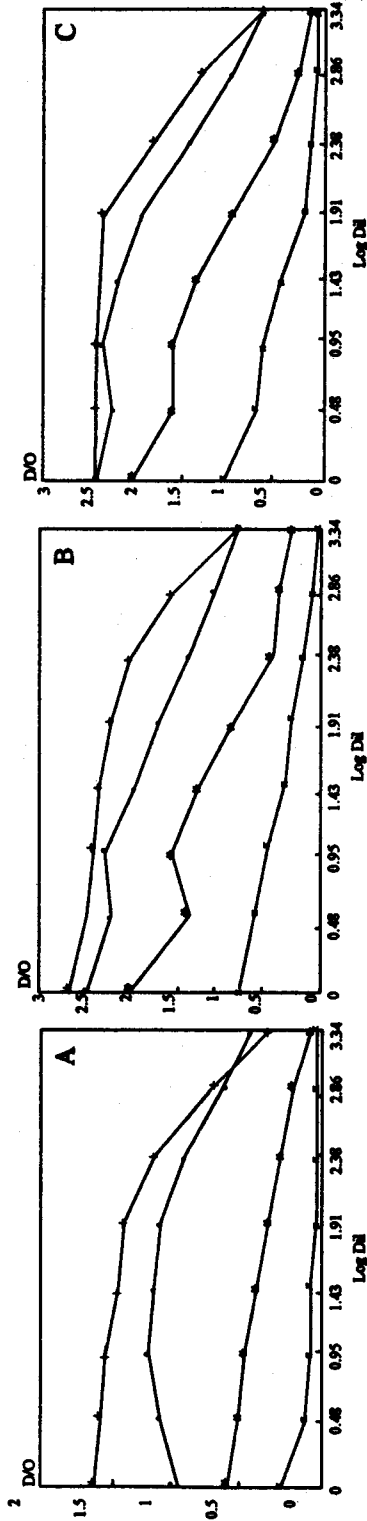
Los hibridomas positivos seleccionados se clonaron por dilución límite y se cultivaron en medio de crecimiento con 2% de HT y 15% de suero fetal bovino.

Durante toda la fase de clonaje y ampliación de los hibridomas para la obtención de sobrenadantes, se empleó la técnica de ELISA indirecta, para la verificación de la estabilidad de los cultivos.

Se obtuvieron ocho anticuerpos monoclonales a partir de las fusiones realizadas (Figura 1). En cada caso los isotipos respectivos se determinaron por medio de IDGA, empleando antisueros específicos para cada isotipo (Cuadro 1).

CUADRO 1. Determinación de los isotipos de los anticuerpos monoclonales por inmunodifusión en gel de agar.

Anticuerpo monoclonal	K	-	IgG1	IgG1a	IgG2b	IgG3	IgM
38Ah11	+	-	-	+	-	-	-
38BC3	+	-	-	+	-	-	-
38BD11	+	-	-	+	-	-	-
38EC8	+	-	-	-	+	-	-
38ED6	+	-	-	+	-	-	-
38BE10	+	-	-	+	-	-	-
40FD8	+	-	-	+	-	-	-
40HD5	+	-	-	-	+	-	-



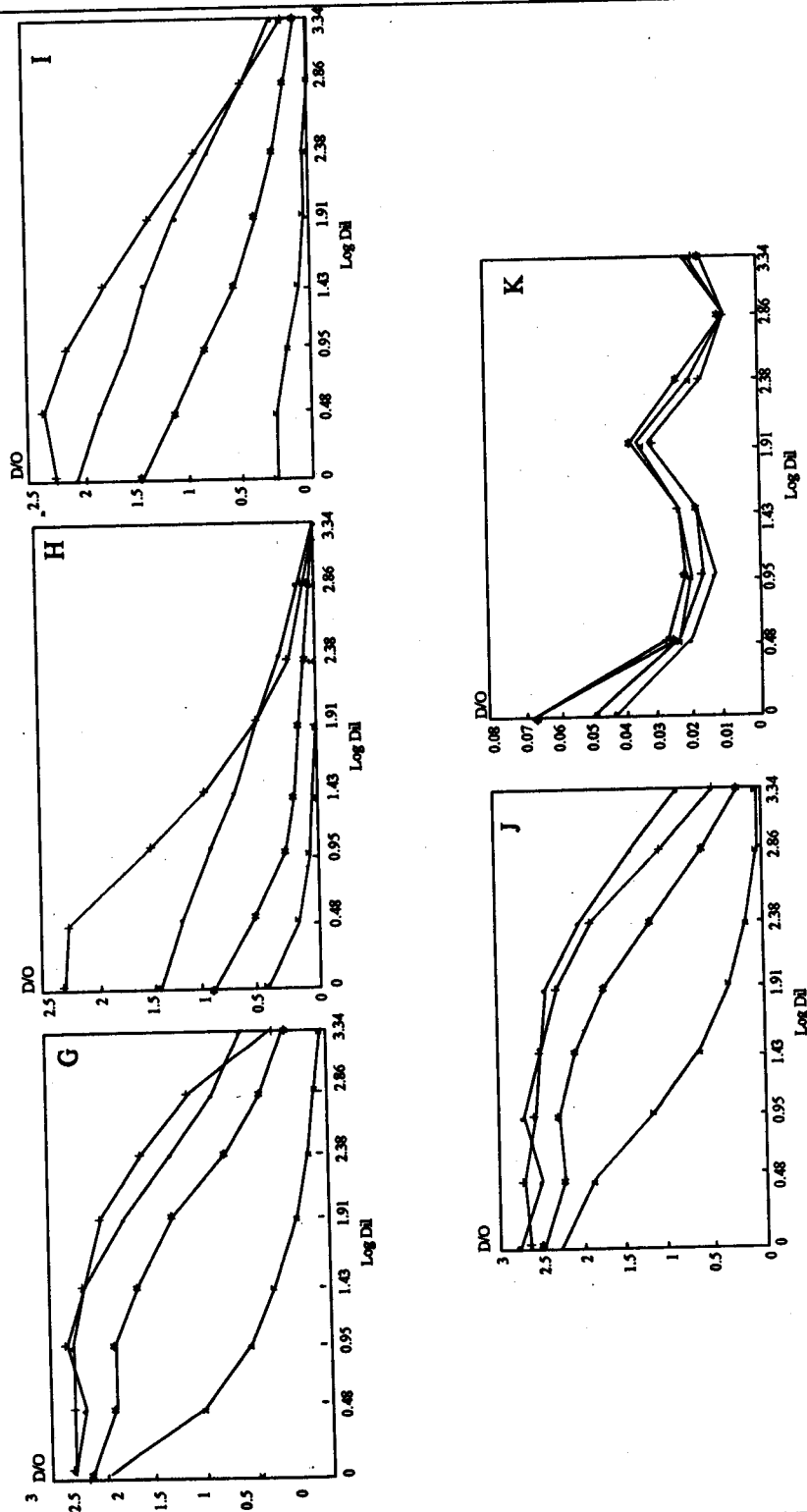


FIGURA 1. Reactividad de los anticuerpos monoclonales frente a los antígenos grupo específicos (PANAF-TOSA, VDI, LARA, NVSL) a través de la prueba de ELISA. A 38ED6; B 38BC3; C 38BD11; D 38AH11; E 38EC6; F 39BE10; G 40FD8; H 40HDS; I 3-17-A3; J suero positivo; K anticuerpo monoclonal antiviral de la fiebre aftosa.

+ PANAF-TOSA    • VDI    \* LARA    x NVSL



Los ocho anticuerpos monoclonales se evaluaron en base a su reactividad contra cuatro AGE producidos y utilizados rutinariamente para la detección de anticuerpos anti-LA por IDGA en diferentes laboratorios: PANAFTOSA, Veterinary Diagnostic Technology, Inc. USA (VDT), LARA-Campinas, São Paulo, Brasil, y National Veterinary Service Laboratory - USA, Ames, Iowa (NVSL). Cada AGE fue empleado como fase sólida en la prueba de ELISA indirecta en la reacción con los anticuerpos monoclonales (Figura 1). Como control positivo se empleó un suero hiperinmune de ratón anti-VLA (Figura 1J) y un anticuerpo monoclonal 3-17-A3 (Figura 1I) específico para la proteína grupo específica (P7) de VLA (3, 5) y como control negativo, un anticuerpo monoclonal antiviral C<sub>3</sub> Indaial de la fiebre aftosa (Figura 1K).

Los anticuerpos monoclonales presentaron una mayor reactividad frente al AGE PANAFTOSA, debido al empleo de la cepa homóloga de VLA en la producción de los AGE en PANAFTOSA y en el laboratorio LARA.

La alta reactividad de los monoclonales frente al AGE del laboratorio VDT se justifica posiblemente por la utilización de más de una cepa en la producción de este antígeno. La menor reactividad observada frente al antígeno del laboratorio NVSL podría atribuirse a la utilización de una cepa del VLA que presenta pequeñas variaciones en el segmento del ARN viral, que codifica a la proteína grupo específica entre los varios serotipos de LA, observadas en cepas aisladas de diferentes regiones geográficas (12).

La prueba ELISA de competición, empleando anticuerpos monoclonales, según FAO/IAEA (5) es la más indicada para substituir las pruebas de IDGA, fijación del complemento e inmunofluorescencia en el diagnóstico serológico de LA. Los anticuerpos monoclonales desarrollados en el presente trabajo presentan un gran potencial para su empleo en la prueba ELISA de competición y en estudios epidemiológicos de LA.

Kanashiro et al.

## RECONOCIMIENTO

El autor principal presentó este trabajo a la Universidad Federal Rural de Rio de Janeiro en cumplimiento parcial de los requisitos para el título de *Magister Scientiae* en Microbiología Veterinaria.

## REFERENCIAS

1. AFSHAR, A., THOMAS, F.C., WRIGHT, P.F., SHAPIRO, J.L., ANDERSON, J. Comparison of competitive ELISA, indirect ELISA and standard AGID tests for detecting bluetongue virus antibodies in cattle and sheep. *Vet. Rec.*, 124: 136-141, 1989.
2. ALLENDE, R.S., ARITA, G.M., SÖNDAHL, M.S., ALONSO, A. Identificación de anticuerpos de la lengua azul por la técnica de inmunodifusión en gel de agar. Identification of bluetongue antibodies by the technique of immunodiffusion in agar gel. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 55: 27-30, 31-34, 1989.
3. ANDERSON, J. Use of monoclonal antibody in a blocking ELISA to detect group specific antibodies to bluetongue virus. *J. Immun. Methods*, 74: 139-149, 1984.
4. EATON, B., HYATT, A.D., WHITE, J.R. Localization of the nonstructural protein NS1 in bluetongue virus-infected cells and its presence in virus particles. *Virology*, 163: 527-537, 1988.
5. FAO/IAEA. Consultants group meeting on "International standardisation and supply of reagents of ELISA kits to detect group specific antibodies to bluetongue virus". *Animal Production and Health Newsletter*, 13: 7-8, 1991.
6. GALFRÉ, G., MILSTEIN, C. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. In: GODING, J.W. *Monoclonal antibodies: principles and practices*. London, Academic Press Inc. 1983. pp. 68-69.
7. GODING, J.W. *Monoclonal antibodies: principles and practice*. London, Academic Press Inc. 1983. 276 p.
8. GROOCOCK, C.M., CAMPBELL, C.H. Isolation of an exotic serotype of bluetongue virus from imported cattle in quarantine. *Can. J. Comp. Med.*, 46: 160-164, 1982.
9. HUISMANS, H., ERASMUS, B.J. Identification of the serotype-specific and group-specific antigens of bluetongue virus. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 48: 51-58, 1981.

10. KOWALIK, T.F., K. LI, J.K. Sequence analyses and structural predictions of double-stranded RNA segment S1 and VP7 from United States prototype bluetongue virus serotypes 13 and 10. *Virology*, 172: 189-195, 1984.
11. LEWIS, S.A., GRUBMAN, M.J. Bluetongue virus: surface exposure of VP7. *Vir. Res.*, 16: 17-26, 1990.
12. LUNT, R.A., WHITE, J.R., BLACKSELL, S.D. Evaluation of a monoclonal antibody blocking ELISA for the detection of group-specific antibodies to bluetongue virus in experimental and field sera. *J. gen. virol.*, 69: 2729-2740, 1988.
13. MERTENS, P.P.C., PEDLEY, S., COWLEY, J., BURROGHS, J.N., CORTEYN, A.H., JEGGO, M.H., JENINGS, D.M., GORMAN, B.M. Analysis of the roles of bluetongue virus outer capsid proteins VP2 and VP5 in determination of virus serotype. *Virology*, 170: 561-565, 1989.
14. OBDEYN, M. *Bluetongue: a review of the disease*. Rio de Janeiro, PANAFTOSA, 1987, 58 p (Scientific and Technical Monograph Series, 16).
15. ROY, P. Bluetongue virus genetics and genome structure. Review article. *Vir. Res.*, 13(3): 179-206, 1989.
16. SHULMAN, M., WILDE, C.D., KÖHLE, G. A better cell line for making hybridoma secreting specific antibodies. *Nature*, 176(16): 269-270, 1978.

## PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST GROUP-SPECIFIC BLUETONGUE VIRUS ANTIGEN

M.M. KANASHIRO<sup>1</sup>, E.C. CONTREIRAS<sup>1</sup>, A. ALONSO<sup>2</sup>, H. BARAHONA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Veterinaria, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro,  
Antiga Estrada Rio-São Paulo, Km 47 23851-970 Itaguaí, RJ, Brasil

<sup>2</sup>Pan American Foot-and-Mouth Disease Center (PAHO/WHO)  
P.O. Box 589, 20001-970 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

**Summary.** Monoclonal antibodies (MAbs) against the group-specific antigen of Bluetongue virus were developed using Bluetongue virus serotype 4. The hybridomas were obtained from immunized BALB/c spleen cells fused with myeloma cells line Sp2/O-Ag14 using polyethylenglycol 1500, and cloned by limiting dilution. The supernatant from eight MAbs was tested against group-specific antigens used in agar gel immunodiffusion tests by different laboratories. The eight monoclonal antibodies presented good reactions to the group-specific antigen. Therefore, these MAbs have great potential for application in the identification of group-specific antibodies by competitive ELISA tests.

Bluetongue (BT) is a viral disease that affects mainly sheep and other domestic and wild ruminants. It is widely distributed throughout the African, American, and Australian continents, the Middle East and Southeast Asia. It is transmitted by hematophagous insects, and mosquitoes of the genus *Culicoides* constitute its main vectors (14).

The Bluetongue virus (BTV) belongs to the *Reoviridae* family, genus *Orbivirus*. Based on the virus-neutralization tests, 24 BTV serotypes are recognized (4). The viral genome consists of 10 segments of double-stranded RNA, each one of them coding for at least one viral polypeptide. Five proteins (P1, P3, P4, P6, and P7), out of seven composing the double layered viral particle form the core. The core is surrounded by a diffuse, outer capsid layer composed of P2 and P5 (15).

To date, the functions of the nonstructural proteins NS1, NS1a, NS2, NS3, and NS3a, identified in infected cells as BTV have not been clarified (13).

Polypeptide P2, the main serotype-specific antigen of BTV is responsible for viral neutralization. Together with P5, they are the proteins with the largest variation amongst BTV serotypes (13, 15).

One of the major group-specific proteins of BTV is the P7 polypeptide. It is the most conserved, highly hydrophobic, may be presented in polymeric forms and has at least one epitope in the surface of the viral particle (4, 9, 10, 11).

The serological diagnosis of BTV is carried out mainly by immunodiffusion in agar gel (IDAG) test. This test, despite being simple and practical, presents a low sensitivity, cross reactions with other orbiviruses and its interpretation is subjective (1). On the other hand, the competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using MAbs presents a higher sensitivity and specificity in the detection of antibodies against BTV and does not reveal cross-reactions with other orbiviruses (3). On this basis, FAO/IAEA suggested the International Office of Epizootics (OIE), the international standardization of this ELISA test for the detection of group-specific antibodies against BTV (5).

The present paper describes the production of MAbs against group-specific antigens (GSA),

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

using BTV serotype 4, and its partial characterization against GSA used in the serological diagnosis of BTV by IDAG.

BALB/c mice (6-8 weeks old) and BTV serotype 4 were used (8). The inoculum consisted of  $10^{4.09}$  LD<sub>50</sub>/ml of a second suckling mouse brain passage in 0.3ml, inoculated intraperitoneally at 10 day-intervals. The first inoculation consisted of equal parts of a viral suspension and Freund's complete adjuvant. A viral suspension plus Freund's incomplete adjuvant, also in equal parts, was used in the second and third inoculations. For the fourth and fifth inoculations, only viral suspension was used.

Three days after the last inoculation the spleens from two mice were removed aseptically. They were washed and macerated in modified Dulbecco's medium (DMEM). Subsequently, the macerate was treated with ACK buffer (NH<sub>4</sub>CL, 0.15M; KHCO<sub>3</sub> 0.01M, Na<sub>2</sub> EDTA 2 H<sub>2</sub>O 0.01M) for a minute in cold water and then neutralized with 40ml of DMEM containing 5% of fetal calf serum and 5 IU/ml of heparin. The suspension was centrifuged at 1000 g for 12 minutes at 4°C. The sediment was resuspended in DMEM medium to carry out lymphocyte counts.

In parallel, myeloma cells Sp2/O-Ag14 (16) at the logarithmic growth stage were washed with DMEM medium at a myeloma-lymphocyte ratio of 1:4. The myeloma cells and the lymphocytes were fused by adding 1 ml of polyethylenglycol (PEG) 1500 for every 180 million cells according to the method described by Galfre y Milstein (6,7), modified by the Laboratory of Monoclonal Antibodies of PANAFTOSA.

After the fusion, the cells were cultivated in selective growth medium (DMEM, 4 mM of L-glutamine, 1 mM of sodium pyruvate) with 2% of HAT and 15% of fetal calf serum. The selection of positive hybridomas was carried out through the indirect ELISA test, in which the solid phase contained the GSA of BTV. This GSA was obtained from the supernatants of monolayer cultures of BHK-21 cells inoculated with BTV, according to the method described by Allende *et al.* (2).

The positive hybridomes selected were cloned by limited dilution and cultivated in growth medium with 2% of HT and 15% of fetal calf serum.

Table 1. Monoclonal antibody isotype determination by immunodiffusion in agar gel.

Monoclonal antibody	K	-	IgG1	IgG1a	IgG2b	IgG3	IgM
38Ah11	+	-	-	+	-	-	-
38BC3	+	-	-	+	-	-	-
38BD11	+	-	-	+	-	-	-
38EC8	+	-	-	-	+	-	-
38ED6	+	-	-	+	-	-	-
38BE10	+	-	-	+	-	-	-
40FD8	+	-	-	+	-	-	-
40HD5	+	-	-	-	+	-	-

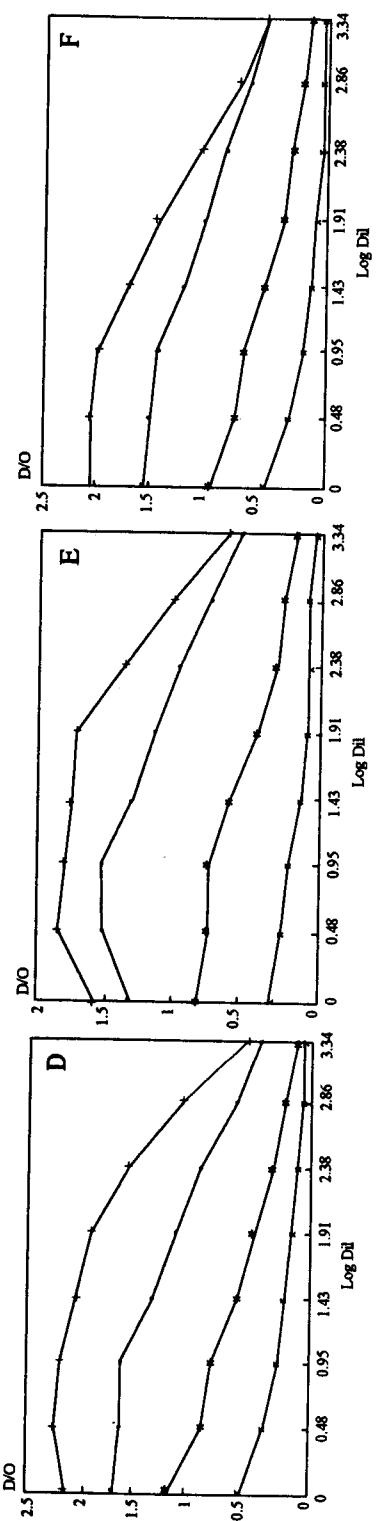
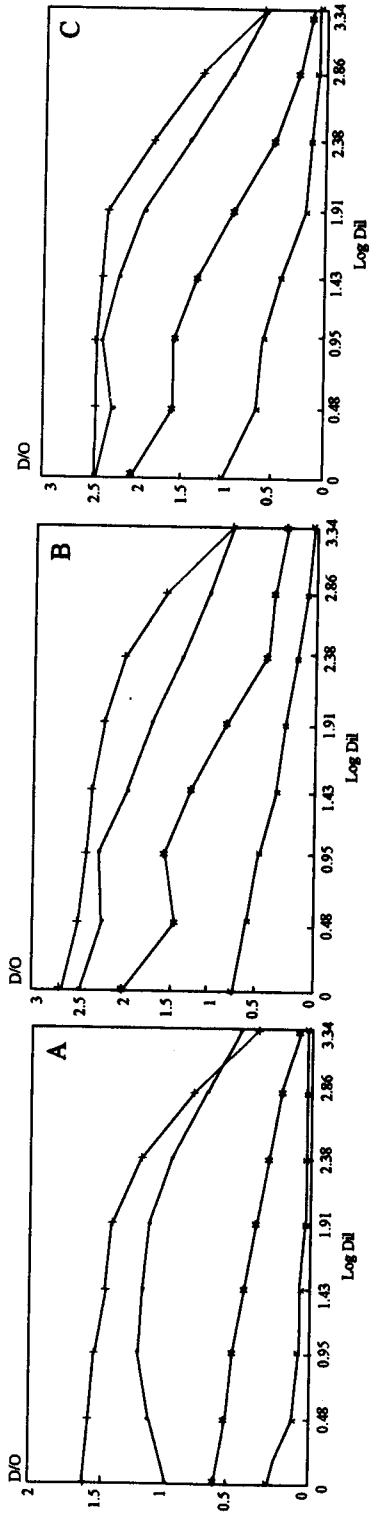
Indirect ELISA tests were used to assess the stability of cultures throughout all stages of cloning and amplification of hybridomes.

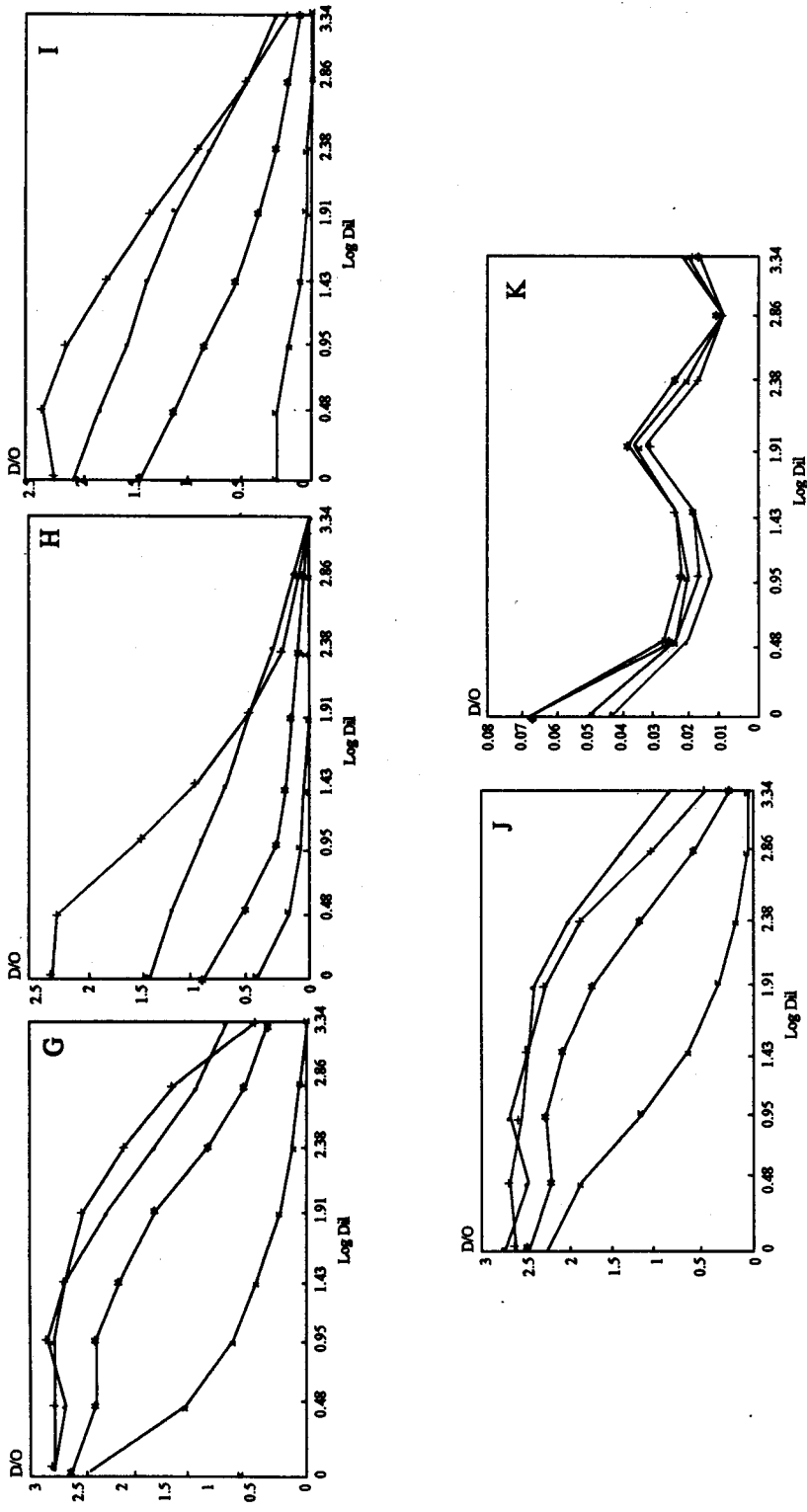
Eight MABs were obtained from these fusions (Figure 1). In each case, the respective isotypes were determined by IDAG using specific antisera for each isotype (Table 1).

The eight MABs were evaluated on the basis of their reactivity against four GSA produced and used routinely for the detection of BTV antibodies by IDAG in different laboratories: PANAFTOSA, Veterinary Diagnostic Technology, Inc., USA (VDT), LARA-Campinas, Sao Paulo (LARA) and National Veterinary Service Laboratory, USA, Ames, Iowa (NVSL). Each GSA embedded in the solid phase of an indirect ELISA test was checked against the eight MABs (Figure 1). A hyperimmune mouse serum against BTV (Figure 1J) and a MAB 3-17-A3 (Figure 1I) specific for the group-specific protein (P7) of BTV were used as positive controls and a foot-and-mouth disease C, Indaial MAB as negative control (3,5) (Figure 1K).

The MABs presented a higher reactivity to PANAFTOSA GSA due to the use of the homologous strain of BTV in the production of GSA at PANAFTOSA and at the LARA Laboratory.

The high reactivity of MABs to GSA from VDT Laboratory is possibly accounted for, due to the use of more than one strain in the production of this antigen. The lower reactivity observed with the antigen from the NVSL may be explained by the use of a strain of BTV that presents small variations in





**FIGURE 1. Reactivity of monoclonal antibodies to group specific antigens (PANAFOTOSA, VDT, LARA, NVSL) by ELISA test. A 38ED6, B 38BC3, C 38BD11, D 38AH11, E 38EC6, F 39BE10, G 40FD8, H 40HDS, I 3-17-A3, J Positive Serum, K monoclonal antibody against foot-and-mouth disease virus.**

+ PANAFOTOSA      • VDT      \* LARA      X NVSL

the viral RNA segment that codes for the group-specific protein amongst the various BT serotypes, observed in strains isolated in different geographical regions (12).

According to FAO/IAEA (5) in the competitive ELISA test, using MAbs is the most indicated to replace the IDAG, complement fixation, and immunofluorescence tests, in the serologic diagnosis of BT. The MAbs developed in the present study suggest a great potential for their use in competitive ELISA tests and in epidemiological studies of BT.

### ACKNOWLEDGEMENT

This study was presented by the senior author at the Universidade Federal Rural de Rio de Janeiro, in partial fulfillment of the requirements for the degree of *Magister Scientiae* in Veterinary Microbiology.

### REFERENCES

1. AFSHAR, A., THOMAS, F.C., WRIGHT, P.F., SHAPIRO, J.L., ANDERSON, J. Comparison of competitive ELISA, indirect ELISA and standard AGID tests for detecting bluetongue virus antibodies in cattle and sheep. *Vet. Rec.*, 124: 136-141, 1989.
2. ALLENDE, R.S., ARITA, G.M., SÖNDAHL, M.S., ALONSO, A. Identificación de anticuerpos de la lengua azul por la técnica de inmunodifusión en gel de agar. Identification of bluetongue antibodies by the technique of immunodifusion in agar gel. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 55: 27-30, 31-34, 1989.
3. ANDERSON, J. Use of monoclonal antibody in a blocking ELISA to detect group specific antibodies to bluetongue virus. *J. Immun. Methods*, 74: 139-149, 1984.
4. EATON, B., HYATT, A.D., WHITE, J.R. Localization of the nonstructural protein NS1 in bluetongue virus-infected cells and its presence in virus particles. *Virology*, 163: 527-537, 1988.
5. FAO/IAEA. Consultants group meeting on "International standardisation and supply of reagents of ELISA kits to detect group specific antibodies to bluetongue virus". *Animal Production and Health Newsletter*, 13: 7-8, 1991.
6. GALFRÉ, G., MILSTEIN, C. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. In: GODING, J.W. *Monoclonal antibodies: principles and practices*. London, Academic Press Inc. 1983. pp. 68-69.
7. GODING, J.W. *Monoclonal antibodies: principles and practice*. London, Academic Press Inc. 1983. 276 p.
8. GROOCOCK, C.M., CAMPBELL, C.H. Isolation of an exotic serotype of bluetongue virus from imported cattle in quarantine. *Can. J. Comp. Med.*, 46: 160-164, 1982.
9. HUISMANS, H., ERASMUS, B.J. Identification of the serotype-specific and group-specific antigens of bluetongue virus. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 48: 51-58, 1981.
10. KOWALIK, T.F., K. LI, J.K. Sequence analyses and structural predictions of double-stranded RNA segment S1 and VP7 from United States prototype bluetongue virus serotypes 13 and 10. *Virology*, 172: 189-195, 1984.
11. LEWIS, S.A., GRUBMAN, M.J. Bluetongue virus: surface exposure of VP7. *Vir. Res.*, 16: 17-26, 1990.
12. LUNT, R.A., WHITE, J.R., BLACKSELL, S.D. Evaluation of a monoclonal antibody blocking ELISA for the detection of group-specific antibodies to bluetongue virus in experimental and field sera. *J. gen. virol.*, 69: 2729-2740, 1988.
13. MERTENS, P.P.C., PEDLEY, S., COWLEY, J., BURROGHS, J.N., CORTEYN, A.H., JEGGO, M.H., JENINGS, D.M., GORMAN, B.M. Analysis of the roles of bluetongue virus outer capsid proteins VP2 and VP5 in determination of virus serotype. *Virology*, 170: 561-565, 1989.
14. OBDEYN, M. *Bluetongue: a review of the disease*. Rio de Janeiro, PANAFTOSA, 1987, 58 p (Scientific and Technical Monograph Series, 16).
15. ROY, P. Bluetongue virus genetics and genome structure. Review article. *Vir. Res.*, 13(3): 179-206, 1989.
16. SHULMAN, M., WILDE, C.D., KÖHLE, G. A better cell line for making hybridoma secreting specific antibodies. *Nature*, 176 (16):269-270, 1978.

## DESARROLLO DE UNA PRUEBA ELISA PARA IDENTIFICAR ANTICUERPOS ANTIVIRUS DE ESTOMATITIS VESICULAR INDIANA-3

R. ALLENDE<sup>1</sup>, L.M. SEPULVEDA<sup>1</sup>, A. ALONSO<sup>1</sup>, F.B. RANGEL FILHO<sup>2</sup>

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

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

<sup>2</sup>Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Antiga Estrada Rio-São Paulo Km 47, 23851-970 Itaguaí, RJ, Brasil

**Resumen.** La prueba ELISA de competición en fase líquida fue adaptada para la identificación de anticuerpos antiviral de estomatitis vesicular serotipo Indiana-3, usando como antígeno la glicoproteína viral. La validez y repetibilidad de la prueba se determinó por el estudio de 533 sueros de animales negativos y 305 sueros de animales positivos, obteniéndose una sensibilidad de 99% y una especificidad de 100%. No se observaron diferencias significativas entre las repeticiones de la prueba. Los valores predictivos de los resultados, positivo y negativo, y el valor global de la prueba estudiada indican que la ELISA es un método satisfactorio para identificar anticuerpos de estomatitis vesicular.

El virus de la estomatitis vesicular (VEV) pertenece a la familia *Rhabdoviridae*, género *Vesiculovirus*, del que se reconocen dos serotipos: New Jersey e Indiana (17). Este último serotipo se subdivide en tres subtipos (9): VEV Indiana-1, identificado junto al VEV New Jersey en regiones endémicas del sudeste de los EE.UU., México, América Central, Panamá, Venezuela, Colombia, Ecuador y Perú (18, 20); VEV Indiana-2, identificado en Trinidad (13), Argentina (11) y Brasil (21); y VEV Indiana-3, aislado a partir de animales domésticos, solamente en Brasil (4).

La estomatitis vesicular (EV) afecta principalmente a los equinos, bovinos y porcinos, causando lesiones vesiculares en la boca, las patas y la ubre. Al igual que otras enfermedades vesiculares, ésta se encuentra incluida en la lista

"A" de la Oficina Internacional de Epizootias. En general, este grupo de enfermedades se caracteriza por tener un gran poder de difusión, por lo que pueden extenderse más allá de las fronteras nacionales, con consecuencias socioeconómicas y sanitarias graves. Su incidencia en el comercio internacional de animales y productos pecuarios es importante puesto que su presencia en determinadas regiones representa un factor limitante para el intercambio comercial de productos pecuarios.

Actualmente, el movimiento de animales que resulta de las actividades de importación/exportación entre diferentes regiones, incluye el análisis previo de los sueros para detectar la presencia de anticuerpos anti-VEV. A tal efecto, las pruebas serológicas más usadas son la virusneutralización (1, 6, 8, 10), y ELISA (3, 22, 25). La virusneutralización es una prueba sensible, cuya ejecución requiere el uso de virus infeccioso, una infraestructura de laboratorio de cultivos celulares y un período de incubación de 2-3 días previos a la obtención de resultados. En ciertos casos, se han observado

Solicitar separatas al:

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS)



reacciones inespecíficas en sueros de animales sanos provenientes de regiones libres de EV, sin sospecha clínica ni epidemiológica de la enfermedad (14, 24). Empleando una prueba de ELISA indirecta desarrollada para identificar anticuerpos anti-VEV New Jersey (25) se han encontrado reacciones cruzadas entre ambos serotipos del VEV. Posteriormente, se desarrolló una prueba ELISA de competición en fase líquida que utiliza la glicoproteína viral como antígeno (3), la que, por sus resultados específicos, permitió diferenciar anticuerpos contra los VEV New Jersey e Indiana-1.

El objetivo del presente trabajo consistió en estudiar la prueba ELISA de competición en fase líquida, que emplea como antígeno la glicoproteína viral (no infecciosa), en lo que respecta a la validez y repetibilidad de resultados para la identificación de anticuerpos anti-VEV Indiana 3.

## MATERIALES Y METODOS

### Antígenos

*Virus:* La cepa del VEV Indiana-3 Br/86, aislada en 1986 a partir de epitelio lingual de bovinos del municipio de Resende (RJ, Brasil), se replicó en células BHK21. Cuando se alcanzó aproximadamente un 80% de efecto citopático, las suspensiones virulentas se sometieron a procesos de congelación y descongelación y posteriormente, se clarificaron por centrifugación a 1000 g durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido se fraccionó en ampollas de 1 ml, conservándose en nitrógeno líquido a -170°C. El antígeno así obtenido (AgVN) fue utilizado para la obtención de las glicoproteínas.

*Glicoproteína (Ag Gl):* La glicoproteína se preparó conforme procedimiento ya descrito (3), a partir de suspensiones del AgVN. El AgGl se utilizó para realización de la prueba de ELISA.

*Antígeno para producir sueros de captura (AgIBRS-2):* La cepa VEV Indiana-3 Br/86 se replicó en células IBRS-2. El procedimiento seguido para obtener las suspensiones virulentas fue el mismo que para preparar AgVN. Una vez recolectado, el AgIBRS-2 se concentró por ultracentrifugación a 75000 g, durante 60 minutos (Sorvall 75). El sedimento se resuspendió en solución tampón

fosfato (PBS) a 5% del volumen original. Este antígeno se utilizó para la elaboración del correspondiente suero hiperinmune de conejo.

### Sueros hiperinmunes

El suero hiperinmune de conejo (anticuerpos de captura) y el suero hiperinmune de cobayo (anticuerpos detectores) para el VEV Indiana-3 Br/86 se prepararon según los procedimientos ya descritos (3).

### Sueros de referencia

El suero obtenido de un equino convaleciente de una infección natural por VEV Indiana-3 Br/86 se utilizó como suero control positivo en todas las pruebas. Como control negativo, se utilizó suero fetal bovino. Como control heterólogo, se utilizaron dos sueros de bovinos inoculados experimentalmente, uno con VEV New Jersey y otro con VEV Indiana-1, gentilmente suministrados por el ICA-Colombia.

Se inocularon 20 cobayos adultos por la vía intradermopltar con VEV Indiana-3 Br/86, previamente adaptado a la especie. Se recogieron muestras de sueros antes de la inoculación, y en los días 3, 5, 7, 14, 21, 28 y 90 postinfección. Una vez inactivados a 56°C por 30 minutos, los sueros se conservaron a -20°C.

### Sueros para la ejecución de las pruebas serológicas

Dada la imposibilidad de inocular bovinos y equinos con el VEV por razones de seguridad biológica, se adoptó el criterio epidemiológico para clasificar los sueros en positivos y negativos. Se formó una colección de sueros negativos, provenientes de animales de regiones libres de EV (18, 20) y otra colección de sueros positivos, provenientes de animales de regiones con actividad del VEV Indiana-3 Br/86 (18, 20). Todos los sueros se inactivaron y conservaron a -20°C.

*Sueros de regiones libres de VEV Indiana-3:* Este grupo estaba formado por 533 muestras de suero, cuya procedencia se detalla a seguir: 294 sueros bovinos y 56 sueros porcinos provenientes de

Chile (Servicio Agrícola Ganadero, Chile); 102 sueros bovinos provenientes de Uruguay (Dirección de Lucha contra la Fiebre Aftosa, Uruguay) y 25 sueros bovinos provenientes de Italia, 32 sueros equinos provenientes de EE.UU., y 24 sueros equinos provenientes de Argentina (PANAFTOSA).

*Sueros de regiones con actividad de VEV Indiana-3:* Este grupo estaba formado por 305 sueros pertenecientes a la colección de sueros de PANAFTOSA. Dichos sueros, recolectados en diferentes estados del Brasil comprendían 65 sueros de equinos con lesiones vesiculares por VEV Indiana-3; 19 sueros de bovinos con lesiones vesiculares por VEV Indiana-3, y 221 sueros de porcinos clínicamente sanos, provenientes de establecimientos frigoríficos del estado de Pará, y previamente diagnosticados como positivos, en base a los resultados de la prueba de virusneutralización (5).

## ELISA

Los reactivos utilizados en la prueba de ELISA de competición en fase líquida se titularon inicialmente, para conocer su dilución óptima de uso, utilizando la prueba de ELISA sandwich indirecta (23). Como soporte sólido, en todas las pruebas de ELISA, se usaron placas de poliestireno de fondo plano (Nunc Maxisorp)\*. Los anticuerpos de captura se disolvieron en tampón carbonato-bicarbonato 0,05M pH 9,6; el sustrato de la peroxidasa en tampón ácido, y los restantes reactivos de la prueba en tampón de dilución (PBS pH 7,4, con el agregado de 0,05% Tween 20, 1% ovoalbúmina, 2% suero normal de conejo y 2% suero normal de cada especie animal en estudio). Después de cada una de las etapas de incubación, se realizaron tres lavados (200  $\mu$ l/cavidad/lavado) con solución salina fisiológica conteniendo 0,05% de Tween 20.

*Captura:* Los anticuerpos de captura de conejo diluidos en su dilución óptima de uso se colocaron en la placa en volumen de 100  $\mu$ l/cavidad e incubados durante 18 h a 4°C. El reactivo no

\* La mención de firmas comerciales o de sus productos se hace con fines de identificación y no implica su endoso por los autores o sus respectivas instituciones.

adsorbido se eliminó por inversión de la placa, y se bloqueó con 100  $\mu$ l/cavidad de ovoalbúmina (GV SIGMA)\* 1% en PBS durante 60 minutos a 25°C. Concluida esta etapa, el reactivo excedente se retiró por simple inversión de las placas. Estas se cubrieron con plástico adhesivo y se conservaron invertidas a -20°C, hasta el momento de usarlas.

*Fase líquida:* En una placa auxiliar, los sueros problema y los controles positivo y negativo se diluyeron en base 5 hasta 1:3125. A cada dilución se le agregó un volumen igual del antígeno de glicoproteína previamente titulado. Se incluyeron controles de antígeno y blanco de prueba (Figura 1). La mezcla suero-antígeno se incubó durante 60 minutos a 37°C.

*Transferencia:* Las placas con la captura se descongelaron, manteniéndolas 20 minutos a 4°C, 20 minutos a 25°C, y 20 minutos a 37°C. Posteriormente, la mezcla suero-virus fue transferida a esta placa a razón de 50  $\mu$ l/cavidad, comenzándose por la línea H y terminando por la línea A (Figura 1). Se tomó la precaución de homogeneizar con la pipeta antes de retirar la muestra que debe ser transferida en cada línea. En esta etapa la reacción se incubó a una temperatura de 37°C durante 30 minutos, en un agitador con movimiento circular lento.

*Detector:* Los sueros detectores se diluyeron en su dilución óptima de uso y se incubaron a 37°C por 30 minutos, antes de ser colocados en la placa. Cuando se estudiaron sueros de cobayos y de porcinos, se utilizó un detector preparado en ratón, con el propósito de evitar reacciones cruzadas cobayo/porcino. Para las otras especies, siempre se utilizó un detector de cobayo a un volumen de 50  $\mu$ l/cavidad, y se incubó a 37°C por 30 minutos con agitación circular lenta.

*Conjugado:* El conjugado anti-especie-peroxidasa se agregó en un volumen de 50  $\mu$ l/cavidad y se incubó a las mismas condiciones que en la etapa anterior. Posteriormente, se adicionó el sustrato OPD (orthophenilendiamina) diluido en tampón ácido y se incubó a 25°C durante 15 minutos, protegido de la luz. Transcurrido este plazo, la reacción se detuvo agregando 50  $\mu$ l/cavidad de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3N al sustrato que estaba en la placa.

Sueros:	N° 1	N° 2		N° 3		N° 4		N° 5		Pos.	Neg.	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:20	1:2
B	1:10										1:100	1:10
C	1:50										1:500	1:50
D	1:250										1:2500	1:250
E	1:1250										1:12500	1:1250
F	1:6250										1:62500	1:6250
G	CONTROL DE ANTIGENO											
H	BLANCO											

FIGURA 1. Distribución de los sueros problema en dilución final, y los controles positivos, negativo, de antígeno y blanco en la placa de ELISA.

*Lectura e interpretación de la prueba de ELISA:* La prueba se leyó en un espectrofotómetro con filtro de 492 nm. Se consideró como valor 100% de absorbancia a la media de las lecturas obtenidas en las 12 cavidades correspondientes al control de antígeno (línea G). A partir de este valor, se calcularon los títulos de los sueros, que corresponden a la dilución, expresada en log 10, que dio un 50% del valor obtenido en el control de antígeno.

**Análisis estadístico**

A partir de los datos obtenidos en las diferentes etapas del estudio se calcularon la sensibilidad (S) y especificidad (E) de la prueba de ELISA, así como los valores predictivos de los resultados positivos (VPR+) y negativos (VPR-). Además, se determinó el valor global de la prueba (12).

Para el análisis de la repetibilidad de la prueba de ELISA se utilizó un diseño experimental de bloques casualizados con cuatro repeticiones en cinco bloques. El nivel de significancia de las repeticiones se calculó por test F, estableciéndose como hipótesis de trabajo que no había diferencia significativa entre las repeticiones de un mismo suero. El nivel de rechazo de la hipótesis nula fue establecido en 5%, correspondiendo  $F_t = 3,06$  (16).

Allende et al.

**RESULTADOS**

**Titulación de sueros de referencia**

Las Figuras 2 y 3 muestran los gráficos de las titulaciones por ELISA de los sueros de referencia, frente al antígeno VEV Indiana-3 Br/86. La distribución de los resultados de las titulaciones de los sueros de animales de regiones libres y endémicas, frente al antígeno Indiana-3 Br/86, se presenta en la Figura 4.

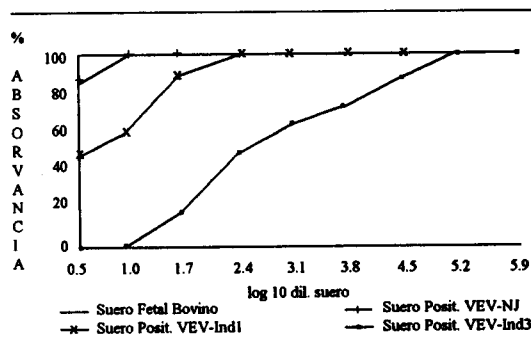


FIGURA 2. Representación gráfica de los títulos de ELISA de los sueros de referencia frente al antígeno glicoproteína VEV Indiana-3 Br/86.

## Validez de la prueba ELISA

**Sensibilidad y especificidad:** De los resultados representados en la Figura 4, se eligió el valor 1,0 log 10 como valor discriminante positivo/negativo de la prueba de ELISA. Se construyó el Cuadro 1, y a partir del mismo, se calcularon los valores de especificidad (E) de 100% y sensibilidad (S) de 99%, así como los VPR+, VPR- y valor global de la prueba. En el Cuadro 2 se muestran estos valores, junto con la proporción de los parámetros de validez de la prueba de ELISA y se

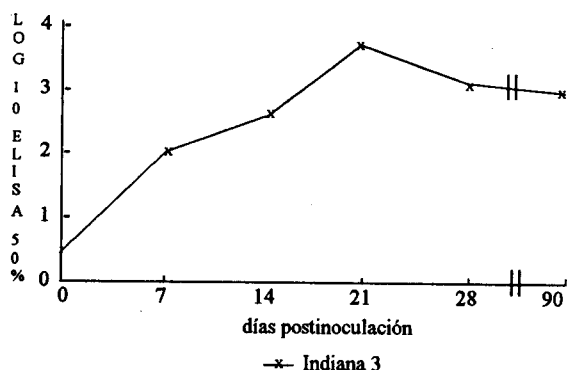


FIGURA 3. Representación gráfica de los títulos de ELISA en los sueros de referencia de cobayos inoculados con VEV Indiana-3 Br/86, estudiados frente al antígeno de glicoproteína de VEV Indiana-3 Br/86.

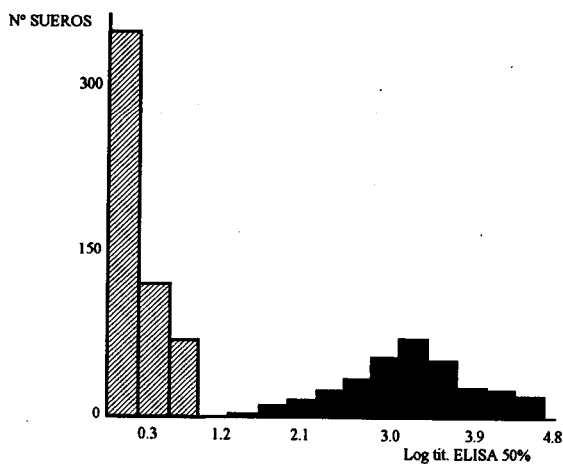


FIGURA 4. Representación gráfica de los resultados de las titulaciones por ELISA de los sueros de regiones libres (▨) y de actividad viral del VEV Indiana-3 (●).

CUADRO 1. Sueros de regiones libres y de actividad de VEV Indiana-3 clasificados por la prueba de ELISA según el valor discriminante.

Región	Valor	log 10	Total
	>1,0	< 1,0	
Actividad	302	3	305
Libre	0	533	533
Total	302	536	838

comparan con el criterio epidemiológico para los límites de confianza iguales a 95%.

**Repetibilidad:** Los resultados de las repeticiones de las titulaciones de tres sueros y su análisis de varianza se muestran en los Cuadros 3 y 4. La hipótesis nula fue aceptada en todos los casos ( $F_c < F_t$ ).

## DISCUSION

Los valores predictivos del resultado positivo y del resultado negativo y el valor global determinados aquí, indican que la prueba ELISA es un método satisfactorio para identificar anticuerpos de EV. Los valores de sensibilidad y especificidad obtenidos en este estudio concuerdan con los obtenidos anteriormente para los serotipos New Jersey e Indiana-1 (3).

El comportamiento de los sueros de referencia (Figura 2) mostró que la prueba ELISA es específica en la identificación de anticuerpos

CUADRO 2. Valores obtenidos para la determinación de la validez de la prueba ELISA en comparación con el método epidemiológico para límite de confianza (LC) de 95%.

	%	LC
Sensibilidad	99,0	0,674
Especificidad	100,0	--
VPR +	100,0	--
VPR -	99,4	0,523
Valor global	99,6	0,400

VPR = Valores predictivos.

CUADRO 3. Valores expresados en  $\log_{10}$ , obtenidos en las repeticiones de las titulaciones de tres sueros por ELISA.

		Tratamientos				
		A	B	C	D	E
Suero N° 1		3,63	3,26	3,26	3,55	3,38
	R	3,57	3,26	3,26	3,58	3,43
	E	3,20	3,40	3,40	3,52	3,52
	P.	3,34	3,43	3,42	3,41	3,43
	Totales	13,74	13,35	13,34	14,06	13,76
Suero N° 2		2,60	2,09	2,19	2,32	2,15
	R	2,56	2,05	2,20	2,32	2,20
	E	2,40	2,38	2,33	2,15	2,36
	P.	2,31	2,37	2,25	2,37	2,30
	Totales	9,87	8,89	8,97	9,16	9,01
Suero N° 3		2,92	2,60	2,56	2,90	2,73
	R	2,83	2,55	2,60	2,91	2,71
	E	2,66	2,80	2,78	2,71	2,75
	P.	2,74	2,76	2,74	2,57	2,74
	Totales	11,75	10,71	10,68	11,09	10,93

para el antígeno homólogo, apreciándose reacciones cruzadas mínimas entre los serotipos New Jersey e Indiana. Estas últimas se deben a la presencia de determinantes antigénicos comunes a ambos serotipos en la glicoproteína del VEV (15). La reacción cruzada entre los VEV Indiana-1 e Indiana-3 se explica por la estrecha relación serológica que existe entre ambos virus según lo descrito anteriormente (2, 7, 9, 19).

Cuando se estudiaron los sueros de cobayos inoculados con el VEV Indiana-3, se vio que la ELISA era capaz de detectar una variación en el título de anticuerpos al tercer día postinfección, obteniéndose el título máximo a los 21 días (Figura 3).

La distribución de los resultados de la Figura 4 muestra que no existe área de superposición entre las titulaciones de los sueros negativos y positivos. Esto puede deberse a que los sueros positivos provenían de animales con sintomatología clínica o ya recuperados de la enfermedad, y por lo tanto, presentaban títulos altos de anticuerpos. Dadas las limitaciones del estudio, no fue posible contar con sueros de las etapas iniciales de la enfermedad, los que posiblemente aproximarían a ambas curvas.

Allende et al.

El valor discriminante positivo/negativo elegido fue de 1,0  $\log_{10}$ . En el caso de que el animal estuviese en la etapa inicial de la enfermedad, podría presentarse un título menor a 1,0. Este problema puede superarse por la práctica de analizar por lo menos dos muestras consecutivas de suero, tomadas a intervalos de 2-3 semanas.

Para minimizar las reacciones inespecíficas de la prueba, se utilizó como captura un suero hiperinmune de conejo producido con antígeno replicado en células IBRS-2. Por otra parte, el suero detector de cobayo se preparó mediante la infección y reinfección de cobayos con VEV Indiana-3, previamente adaptado a esta especie. Al trabajar con la glicoproteína como antígeno de prueba, se evitan las reacciones inespecíficas dadas por las proteínas internas del virus M,N,Ns y L, ya observadas por otros autores (25).

Otro aspecto importante de estudio fue la adsorción de todos los reactivos de la prueba antes de su uso. Para este fin, se preparó un tampón de dilución que contenía 2% de suero normal de conejo y 2% de suero normal de cada una de las especies en estudio. Una vez diluidos, todos los reactivos de la prueba se incubaron también a 37°C durante 30 minutos, evitándose así la formación de gradientes de temperatura en la placa. De esta

CUADRO 4. Análisis de varianza de las titulaciones por ELISA de tres sueros repetidos 20 veces cada uno.

Causas de Variación		GI	SQ	QM	Fc	Ft*
Suero N° 1	Trat.	4	0,091	0,023	1,77	< 3,06
	Erro Exp.	15	0,197	0,013		
	Total	19	0,288			
Suero N° 2	Trat.	4	0,159	0,040	2,85	< 3,06
	Erro Exp.	15	0,216	0,014		
	Total	19	0,375			
Suero N° 3	Trat.	4	0,045	0,011	0,846	< 3,06
	Erro Exp.	15	0,197	0,013		
	Total	19	0,242			

\* alfa = 5%

manera se consiguió eliminar las reacciones inespecíficas de la prueba, obteniéndose un mínimo (no apreciable visualmente) de color de fondo en las placas. El bloqueo de las placas sensibilizadas, con ovoalbúmina GV, permitió conservar la estabilidad de los anticuerpos de captura a -20°C, por períodos superiores a 12 meses. Cuando las placas se usaron inmediatamente después de sensibilizadas con el anticuerpo de captura, no fue necesario tratarlas con ovoalbúmina.

La sensibilidad, especificidad y repetibilidad de la ELISA padronizada en las condiciones de este experimento, sumado a la rapidez y simplicidad con que se procesa, hacen que la misma sea apropiada y preferida a otras pruebas serológicas, como la virusneutralización, para realizar estudios de anticuerpos en poblaciones animales. Además tiene la gran ventaja de utilizar un antígeno no infeccioso, lo que hace posible su uso en regiones libres de la enfermedad, en apoyo a los programas de vigilancia epidemiológica de enfermedades vesiculares.

### RECONOCIMIENTOS

Los autores agradecen a los Drs. Jefferson Johnston Carcamo (SAG, Chile) y Jorge Baltar Tavares (DILAVE, Uruguay) por haber proporcionado sueros de animales oriundos de regiones libres de EV.

La autora principal presentó este trabajo a la Universidad Federal Rural de Río de Janeiro, en cumplimiento parcial de los requisitos para el título de *Magister Scientiae* en Medicina Veterinaria Preventiva.

### REFERENCIAS

1. ALONSO, A. *Manual de diagnóstico de laboratorio de las enfermedades vesiculares*. Rio de Janeiro, PANAFTOSA, 1986, 50 p. (Serie de manuales didácticos, 15).
2. ALONSO, A., SÖNDAHL, M.S. 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, 1985.
3. ALLENDE, R., SEPULVEDA, L., SILVA, A.J.M. da, MARTINS, M., SÖNDAHL, M.S., ALONSO, A. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of vesicular stomatitis virus antibodies. *Prev. Vet. Med.*, 14:293-301, 1992.
4. ANDRADE, C.M. Estomatite vesicular no Brasil. Tese de Docência Livre. Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1974.
5. BRANDÃO, C.T.P. Estomatite vesicular em suínos no Estado do Pará. Dissertação de Mestrado. Instituto de Veterinária, UFRRJ, Itaguaí, R.J. 1989, 77 p.
6. CARBREY, E.A. Laboratory diagnosis of vesicular stomatitis. In: *Proc. Int. Conf. Ves. Stomatitis*. Mexico City, Mexico, 24-27 September, 1984, p. 446-456.
7. CARTWRIGHT, B., SMALE, C.J., BROWN, F., HULL, R. Model for vesicular stomatitis virus. *J. Virol.*, 10: 256-260, 1972.
8. CASTAÑEDA, J., LAVERMAN, L.H., HANSON, R.P. Evaluation of virus neutralization tests and association of indices to cattle resistance. *Proc. Annual Meeting of the USA Livestock Sanitary Association*, 68: 455-468, 1964.
9. FEDERER, K.E., BURROWS, R., BROOKSBY, I.B. Vesicular stomatitis virus: the relationship between some strains of the Indiana serotype. *Res. Vet. Sci.*, 8 (1): 103-117, 1967.
10. FERREIRA, M.E.V., OBIAGA, J.A., ALONSO, A., SÖNDAHL, M.S. Diagnóstico y tipificación de virus de estomatitis vesicular por técnica de virusneutralización. *Inf. Epid. Mensual PANAFTOSA*, 11 (5): 58-60, 1979.
11. GARCIA PIRAZZI, A.J., CAGGIANO, C.H., ALONSO, A. Estomatitis vesicular: constatación de la enfermedad y aislamiento del virus. *Gac. Vet.*, 28 (187): 85-91, 1966.
12. JENICEK, M., CLEROUX, R. *Épidemiologie*. Edisem Inc. Canadá, 1983.
13. JONKERS, A.H., SHOPE, R.E., AITKEN, T.H.G., SPENCE, L. Cocal virus, a new agent in Trinidad related to vesicular stomatitis virus, type Indiana. *Am. J. Vet. Res.*, 25: 236-242, 1964.
14. KING, H.J. Summary of vesicular stomatitis Hyatsville Md. Emergency Programs Animals Meeting and Plant Health Inspection Service. US Department of Agriculture, 1983, jan. 11-12.
15. LEFRANCOIS, L., LYLES, D. Monoclonal antibodies to nonneutralizing and cross-reactive epitopes of Indiana and New Jersey serotypes. *Virology*, 121: 168-174, 1982.

16. MARKUS, R. *Elementos de estadística aplicada*. Faculdade de Agronomia. UFRGS. Porto Alegre, Brasil, 1973.
17. MATTHEWS, R.E.F. Classification and nomenclature of viruses. *Intervirology*, 17: 1-199, 1982.
18. O.I.E. Vesicular stomatitis (A/002). Manual of recommended diagnostic techniques and requirements for biological products for lists A and B diseases. Paris, France. V.II, 1990.
19. OZAWA, C.M. Relacionamento sorológico entre os diferentes virus do grupo da estomatite vesicular (VSV). Dissertação de Mestrado. Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 1976. 74 p.
20. PANAFIOSA. Informe epidemiológico de fiebre aftosa y estomatitis vesicular. V.2-22, 1970-1990.
21. PUSTIGLIONE NETTO, L., PINTO, A.A., SUGA, O. Isolamento do vírus, identificação sorológica e levantamento epizootiológico de um surto de estomatite vesicular no Estado de São Paulo. *Arq. Inst. Biol.*, 34 (2): 69-72, 1967.
22. VERNON, S., WEBB, P.A. Recent vesicular stomatitis virus infection detected by immunoglobulin M antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, 22: 582-586, 1985.
23. VOLLER, A., BARLETT, A., BIOWELL, D., CLARK, M., ADAMS, A. The detection of viruses by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Gen. Virol.*, 33: 165-169, 1976.
24. WILKS, C.R., JENNEY, E.W., HOUSE, J.A. Development of an immunoelectroosmophoresis test for the detection and typing of antibodies to vesicular stomatitis viruses. *Can. J. Comp. Med.*, 48: 179-183, 1984.
25. WORKMAN, T., SHEN, D., WOODARD, L., YILMA, T. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine antibodies to vesicular stomatitis virus. *Am. J. Vet. Res.*, 47 (7): 1507-1512, 1986.

#### Anuncios

##### **Reuniones de la Comisión Sudamericana para la Lucha contra la Fiebre Aftosa (COSALFA)**

*Todos los años se realiza una Reunión de los países miembros de la COSALFA, donde se discuten asuntos relacionados al combate contra la fiebre aftosa. Previamente se realiza un Seminario con un tema seleccionado en el Seminario del año anterior.*

1992 - XIX Reunión de la COSALFA. 2 y 3 de abril de 1992, Buenos Aires, Argentina

Seminario Internacional sobre Planes Locales y Zonales con Movilización de Recursos y Participación Comunitaria para la Erradicación de la Fiebre Aftosa. 30 de marzo al 1 de abril de 1992.

1993 - XX Reunión de la COSALFA. 25 y 26 de marzo de 1993, Montevideo, República Oriental del Uruguay

Seminario Internacional sobre Erradicación de la Fiebre Aftosa, sus Fundamentos Técnico-Administrativos y sus consecuencias en el Comercio de Animales, Productos y Subproductos de Origen Animal. 22 al 24 de marzo de 1993.

##### **Actividades de adiestramiento en el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS)**

*Seminarios - Cursos - Adiestramientos en Servicio*

###### *Area de laboratorios:*

- . Diagnóstico Diferencial de Enfermedades Vesiculares;
- . Producción de Vacuna Oleosa;
- . Producción de Anticuerpos Monoclonales;
- . Técnicas de Biología Molecular;
- . Cría y Manejo de Animales de Laboratorio.

###### *Area de Epidemiología, Infraestructura y Servicios:*

- . Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades Vesiculares
- . Desarrollo de Programas de los Servicios de Salud Animal

## DEVELOPMENT OF AN ELISA TEST TO IDENTIFY ANTIBODIES TO VESICULAR STOMATITIS (INDIANA-3) VIRUS

R. ALLENDE<sup>1</sup>, L.M. SEPULVEDA<sup>1</sup>, A. ALONSO<sup>1</sup>, F.B. RANGEL FILHO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pan American Foot-and-Mouth Disease Center (PAHO/WHO)

P.O. Box 589, 20001-970 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>2</sup>Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Antiga Estrada Rio-São Paulo Km 47, 23851-970 Itaguaí, RJ, Brazil

**Summary.** The competitive ELISA in liquid phase was adapted to identify antibodies to vesicular stomatitis Indiana-3 virus using the viral glycoprotein as antigen. Test validity and reproducibility were determined by testing 553 sera from negative animals and 305 sera from positive animals, obtaining values of 99% sensitivity and 100% specificity. No significant differences were observed among repeated tests. Predictive values for positive and negative results, and the overall value of the technique studied indicate that it is a satisfactory method for use in the identification of antibodies to vesicular stomatitis virus.

The vesicular stomatitis (VS) virus (VSV) belongs to the *Rhabdoviridae* family, genus Vesiculovirus, which includes two serotypes: New Jersey and Indiana (17). The Indiana serotype is subdivided into three subtypes (9): VSV-Indiana-1, identified together with VSV-New Jersey in endemic regions of the United States' southeast, Mexico, Central America, Panama, Venezuela, Colombia, Ecuador, and Peru (18,20); VSV-Indiana-2, identified in Trinidad (13), Argentina (11), and Brazil (21); and VSV-Indiana-3, isolated from domestic animals in Brazil only (4).

VS affects mainly horses, cattle, and swine causing vesicular lesions in the tongue, feet, and udder. It is included in list "A" of the International Office of Epizootics, together with other vesicular diseases. These diseases are characterized for having a great ability to spread and may extend beyond national boundaries, with serious socio-economic

and health consequences. Its incidence in the foreign trade of animals and livestock products is therefore important. The presence of VS in certain regions is a limiting factor for the commercial exchange of livestock products.

Today, the movement of animals among different regions, as a result of the import/export activities, includes the previous analysis of sera to detect the presence of antibodies to VSV. The most used serological tests for this purpose are the virus neutralization (1,6,8,10) and ELISA techniques (3,22,25). Virus neutralization is a sensitive test that requires the use of infectious virus, a laboratory infrastructure for cell cultures, and a 2 to 3-day period to obtain the results. In some cases, when analyzing sera from uninfected healthy animals, nonspecific reactions were observed. These sera came from VS-free regions, without suspected epidemiologic clinical disease (14,24). Using an indirect ELISA developed to identify antibodies to VSV-New Jersey (25), cross-reactions were found between both VSV serotypes. Subsequently, the development of a competitive ELISA in liquid phase (3), using viral glycoproteins as antigen,

Reprint requests to:

Pan American Foot-and-Mouth Disease Center (PAHO/WHO)



provided more specific results, allowing the differentiation between VSV-New Jersey and VSV-Indiana-1 antibodies.

The purpose of the present study was an assessment of the validity and reproducibility of the competitive ELISA in liquid phase, using viral glycoprotein (non-infectious) as antigen, to identify antibodies against VSV-Indiana-3.

## MATERIALS AND METHODS

### Antigens

*Virus:* The VSV-Indiana-3 Br/86 strain isolated in 1986, from a bovine tongue epithelium of Resende county (RJ, Brazil), was replicated in BHK21 cells. When approximately 80% cytopathic effect was observed, the viral suspensions were submitted to freezing and thawing processes. Then, they were clarified by centrifugation at 1000g for 10 minutes. The supernatant obtained was placed in 1 ml volume and stored in liquid nitrogen at -170°C. The antigen obtained (VNAg) was used to obtain the glycoproteins.

*Glycoprotein (GLAg):* The glycoprotein was prepared according to the methods previously described (3) from VNAg suspensions. The GLAg was used in the ELISA test.

*Antigen for production of capture sera (IBRS-2Ag):* The VSV-Indiana-3 Br/86 strain was replicated in IBRS-2 cells. The method used to obtain the virulent suspensions was the same as the VNAg. Once the IBRS-2Ag was obtained it was concentrated by ultracentrifugation at 75000 g for 60 minutes (Sorvall 75). The sediment was resuspended to 5% of the original volume in phosphate buffer (PBS). This antigen was used in the production of hyperimmune rabbit serum.

### Hyperimmune sera

The hyperimmune rabbit serum (trapping antibodies) and the hyperimmune guinea pig serum (detector antibodies) for the VSV-Indiana-3 Br/86 were produced according to the methods previously described (3).

Allende et al.

### Reference sera

The serum obtained from a convalescent horse naturally infected with VSV-Indiana-3 Br/86 was used as positive control serum for all tests. Fetal bovine serum was used as negative control. As heterologous control, two sera from cattle inoculated experimentally with VSV-New Jersey or with VSV-Indiana-1 (kindly supplied by ICA-Colombia) were used.

Twenty adult guinea pigs were inoculated by the intradermoplantar route with VSV-Indiana-3 Br/86, previously adapted to this species. Serum samples were collected prior to inoculation and at 3, 5, 7, 14, 21, 28, and 90 days post-infection (dpi). Once inactivated at 56°C for 30 minutes, sera were maintained at -20°C.

### Sera for the execution of serological tests

For reasons of biological safety, inoculation of bovines and equines with VSV was impossible. Epidemiological criteria were adopted to classify the sera into positive and negative groups. A collection of negative sera were formed with animals from VSV free areas (18,20), and another collection of positive sera was obtained from animals from VSV-Indiana 3Br/86 outbreak areas (18,20). All sera were inactivated and stored at -20°C.

*Sera from VSV-Indiana-3 free regions:* This group was formed by 533 serum samples, which consisted of: 294 bovine sera and 56 swine sera from Chile (Livestock Agricultural Service [SAG], Chile); 102 bovine sera from Uruguay (Directorate of Foot-and-Mouth Disease Control [DILFA], Uruguay); 25 bovine sera from Italy, 32 horse sera from USA; and 24 horse sera from Argentina (PANAFTOSA).

*Sera from regions with VSV-Indiana-3 activity:* This group was formed by 305 sera belonging to the serum collection at PANAFTOSA, and they were collected in different states of Brazil: 65 horse sera with vesicular lesions by VSV-Indiana-3; 19 bovine sera with vesicular lesions by VSV-Indiana-3; 221 sera from swine clinically healthy from slaughterhouses of the state of Pará and previously diagnosed as positive by virus neutralization test (5).

## ELISA

The reagents used in the competitive ELISA in liquid phase were previously titrated, to determine the optimal dilution, using the indirect sandwich ELISA (23). As solid support, flat-bottomed polystyrene plates (Nunc Maxisorp\*) were used in all the ELISA tests. The trapping antibodies were diluted in 0.05M carbonate/bicarbonate buffer, pH 9.6, the peroxidase substrate in acid buffer, and the remaining test reagents in dilution buffer (PBS pH 7.4 with 0.05% Tween 20, 1% ovalbumin, 2% normal rabbit serum, and 2% normal serum from each animal species in study were added). All incubation stages were then washed three times (200  $\mu$ l/well/wash) with physiologic saline solution containing 0.05% Tween 20.

**Capture:** The trapping rabbit antibodies were placed at the optimal dilution in a plate, in a volume of 100  $\mu$ l/well, and incubated for 18 h at 4°C. The reagent not adsorbed was eliminated by inversion of plates and the sensitized plates were then blocked with 100  $\mu$ l/well ovalbumin (GV SIGMA) 1% in PBS for 60 minutes at 25°C. After this stage, the excess reagent was removed by simple inversion of plates. Next, they were sealed with plastic, and stored at -20°C until ready to use.

**Liquid phase:** The problem sera and the negative and positive controls were diluted in an auxiliary plate, from neat serum in base 5 through 1:3125. The glycoprotein previously titrated was added to these dilutions in equal volume. Controls of antigen and background readings were included (Figure 1). The serum antigen mixture was incubated for 60 minutes at 37°C.

**Transference:** The pre-sensitized plates, were defrosted and stored for 20 minutes at 4°C, 20 minutes at 25°C, and 20 minutes at 37°C. Afterwards, the serum-virus mixture was transferred to this plate at 50  $\mu$ l/well starting at line H and ending at line A. The precaution was taken of proper mixing with the pipette before removing the sample

to be transferred in each line. At this stage, the plate was incubated for 30 minutes on a plate shaker at 37°C on a slow orbital shaker.

**Detector:** Serum detectors were diluted in a working dilution and incubated for 30 minutes at 37°C, prior to being placed in the plate. When antibodies in guinea pig and swine sera were studied, a detector prepared in mice was used to avoid guinea pig/swine cross reactions. For other species, a guinea pig detector was always used in a volume of 50  $\mu$ l/well, and incubated for 30 minutes at 37°C on a slow orbital shaker.

**Conjugate:** The anti-species-peroxidase conjugate was added at a volume of 50  $\mu$ l/well and incubated as in the previous stage. Afterwards, OPD substrate (orthophenylenediamine) diluted in acid buffer was added, and incubated for 15 minutes at 25°C, protected from the sunlight. Then, the reaction was stopped adding 3N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (50  $\mu$ l/well) to the substrate that was on plate.

**Reading and interpretation of the ELISA test:** The test was read with multiskan at 492nm. The value 100% of absorbance was considered the average of the reading obtained in 12 wells corresponding to the antigen control (line G). From this value, serum titrations were calculated, corresponding to the dilution expressed in log<sub>10</sub>, giving 50% of the value obtained in the antigen control.

### Statistical analysis

From the data obtained in the different stages of the experiment, the sensitivity and specificity of the ELISA were calculated as well as the predictive values of positive (VPR+) and negative (VPR-) results. In addition, the overall value of the test was determined (12).

For the analysis of reproducibility of the ELISA test an experimental chart of randomized blocks, with four reproductions in five blocks, was used. The significance level was calculated by F test, establishing as working hypothesis that there was no significant difference among repeated tests

\* Mention of commercial firms or their products is for identification only and does not imply endorsement by the authors or their institutions.

Sera:	N° 1	N° 2	N° 3	N° 4	N° 5	Pos.	Neg.					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:20	1:2
B	1:10										1:100	1:10
C	1:50										1:500	1:50
D	1:250										1:2500	1:250
E	1:1250										1:12500	1:1250
F	1:6250										1:62500	1:6250
G	ANTIGEN CONTROL											
H	BACK GROUND READINGS											

FIGURE 1. Plan of the ELISA plates showing positions problem of sera, positive and negative serum controls and antigen and blank controls.

of the same serum. The level of rejection of the null hypothesis was established at 5%, corresponding to  $F_t = 3,06$  (16).

**RESULTS**

**Titration of reference sera**

Figures 2 and 3 indicate the charts of reference sera titrated by ELISA using VSV-Indiana-3 Br/86 antigen. The distribution of the results of titrations of animal sera from VSV free and endemic areas is indicated in Figure 4.

**Validity of the ELISA test**

*Sensitivity and specificity:* From the observations made of the results presented in Figure 4, the 1.0 log 10 value was elected as discriminating positive/negative value of the ELISA. Table 1 was prepared, from which the specificity (Sp) value of 100% and sensitivity (S) of 99% were calculated as well as the VPR+, VPR-, and the global value of the test. These are shown in Table 2, together with the proportions of the validity parameters of the ELISA test and are compared to the epidemiological criteria for the confidence limits equal to 95%.

Allende et al.

*Repeatability:* The results of the reproductions of titrations of 3 sera and their analysis of variance are presented in Tables 3 and 4. The null hypothesis was accepted in all cases ( $F_c < F_t$ ).

**DISCUSSION**

As judged by the VPR+ and VPR- as well as the global value determined in this study, the competitive ELISA in liquid phase is a satisfactory

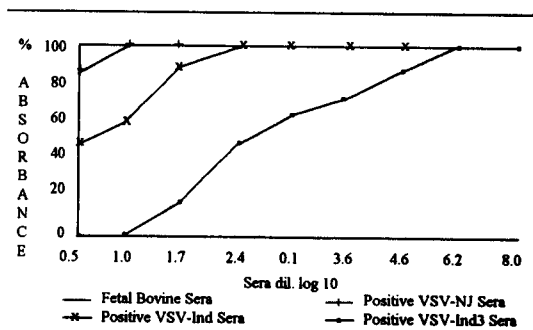


FIGURE 2. ELISA titers of reference sera tested with the VSV Indiana-3 Br/86 glycoprotein antigen.

procedure to identify antibodies to VSV-Indiana-3. Also, the values of sensitivity and specificity obtained were similar with those previously reported for New Jersey and Indiana-1 serotypes (3).

The results of reference sera (Figure 2) showed that the ELISA is specific for the identification of antibodies against the homologous antigen. Minimal cross-reactions were seen between New Jersey and Indiana serotypes. This cross-reactivity is based on the common antigenic determinants that both serotypes share in the VSV glycoprotein (15). The cross-reactions between VSV-Indiana-1 and Indiana-3 may be explained by the close serologic relation between these viruses, as previously described (2,7,9,19).

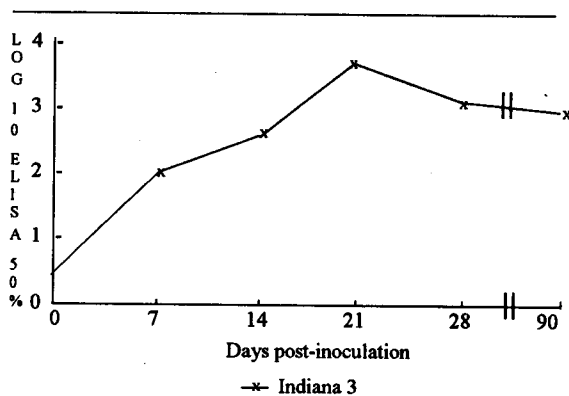


FIGURE 3. ELISA titers to reference sera from guinea pigs inoculated with VSV Indiana-3 Br/86 using VSV Indiana-3 Br/86 glycoprotein antigen.

When sera from guinea pigs inoculated with VSV-Indiana-3 were studied, the ELISA was able to detect an increase in the antibody titre at 3 dpi, reaching its peak at 21 dpi (Figure 3).

The distribution of results in Figure 4 shows that there is no overlapping between the values of negative and positive sera. This could be due to the fact that the positive sera belonged to animals with clinical symptoms, or recovered from the disease and consequently, had high antibody

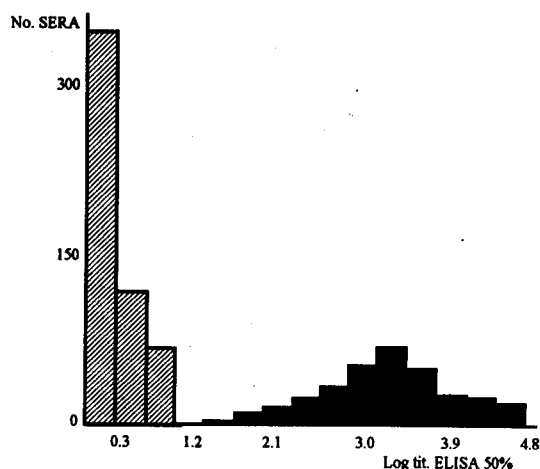


FIGURE 4. Results of titrations by ELISA of sera from regions with and without VSV Indiana-3 viral activity.

titers. It was not possible to have sera taken during the initial stages of the disease, which would probably have shown some overlap both curves.

The ELISA threshold value chosen was 1.0 (log 10). However, if the animal were at the initial stages of disease, it could have antibody titres below 1.0. This potential limitation can be overcome by analyzing at least two serum samples obtained 2-3 weeks apart.

To minimize the unspecific reactions in the test, rabbit antisera produced with antigen replicated in IBRS-2 cells was used as trapping antibody. The detector guinea pig antisera was

TABLE 1. Sera from regions with and without VSV Indiana-3 activity, classified by the ELISA test on the basis of its discriminant value

Region	Value		Total
	$\geq 1,0$	$< 1,0$	
Activity	302	3	305
No activity	0	533	533
Total	302	536	838

**TABLE 2.** Values obtained to determine the validity of the ELISA test in comparison with the epidemiologic method for 95% confidence limit.

	%	LC
Sensitivity	99,0	0,674
Specificity	100,0	-
VPR +	100,0	
VPR -	99,4	0,523
Global Value	99,6	0,400

VPR = Productive value.

produced by hyperimmunization of guinea pigs with infectious VSV Indiana-3 previously adapted to this species. By working with glycoprotein as antigen, unspecific reactions given by internal proteins M,N,NS and L (25) were avoided.

Another important aspect of this study was the adsorption of all test reagents prior to use. For that, we prepared a diluent buffer containing 2% normal rabbit serum and 2% normal serum of each

**TABLE 3.** Values expressed as  $\log_{10}$  of repeat titrations of three sera by ELISA.

Sera		Treatments				
		A	B	C	D	E
No. 1		3,63	3,26	3,26	3,55	3,38
	R	3,57	3,26	3,26	3,58	3,43
	E	3,20	3,40	3,40	3,52	3,52
	P.	3,34	3,43	3,42	3,41	3,43
	Totals	13,74	13,35	13,34	14,06	13,76
No. 2		2,60	2,09	2,19	2,32	2,15
	R	2,56	2,05	2,20	2,32	2,20
	E	2,40	2,38	2,33	2,15	2,36
	P.	2,31	2,37	2,25	2,37	2,30
	Totals	9,87	8,89	8,97	9,16	9,01
No. 3		2,92	2,60	2,56	2,90	2,73
	R	2,83	2,55	2,60	2,91	2,71
	E	2,66	2,80	2,78	2,71	2,75
	P.	2,74	2,76	2,74	2,57	2,74
	Totals	11,75	10,71	10,68	11,09	10,93

Allende et al.

species under test. Once diluted, all test reagents were incubated at 37°C for 30 minutes, avoiding gradients temperature in the plate. Thus, it was possible to obtain a minimal background when reading the plates. The practice to block the sensitized plates with ovalbumin (GV), allowed us to conserve trapping antibody stability for over a 12-month period at -20°C. When the plates were used immediately after sensitization with the trapping antibodies, it was not necessary to block them with ovalbumin.

**TABLE 4.** Analysis of variance of titrations of three sera repeated 20 times, by ELISA.

Causes of variation		GL	SQ	QM	Fc	Ft*
Sera No. 1	Treatment	4	0,091	0,023	1,77	< 3,06
	Exper.error	15	0,197	0,013		
	Total	19	0,288			
Sera No. 2	Treatment	4	0,159	0,040	2,85	< 3,06
	Exp. error	15	0,216	0,014		
	Total	19	0,375			
Sera No. 3	Treatment	4	0,045	0,011	0,846	< 3,06
	Exp. error	15	0,197	0,013		
	Total	19	0,242			

\* alfa = 5%

The sensitivity, specificity and repeatability of the ELISA as standardized under the conditions of the present study, as well as the speed when reading and easy performance of the test process itself, are the main advantages of the test herein reported. These conditions would make the ELISA to be first choice over the other serological tests, such as the virusneutralization, for antibody detection in animal populations. Also, the ELISA has the

advantage of using a non-infectious antigen, which enables its use in disease-free regions, for providing support to the epidemiological surveillance programs of vesicular diseases.

### ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Dr. Jefferson Johnston Carcamo (SAG, Chile) and Dr. Jorge Baltar Tavares (DILAVE, Uruguay) for providing animal sera from VS-free regions.

This work was presented to the Rural Federal University of Rio de Janeiro by the senior author, in partial fulfillment of the requirements for the *Magister Scientiae* degree in Preventive Veterinary Medicine.

### REFERENCES

- ALONSO, A. *Manual de diagnóstico de laboratorio de las enfermedades vesiculares*. Rio de Janeiro, PANAF-TOSA, 1986, 50 p. (Serie de manuales didácticos, 15).
- ALONSO, A., SÖNDAHL, M.S. 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, 1985.
- ALLENDE, R., SEPULVEDA, L., SILVA, A.J.M. da, MARTINS, M., SÖNDAHL, M.S., ALONSO, A. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of vesicular stomatitis virus antibodies. *Prev. Vet. Med.*, 14:293-301, 1992.
- ANDRADE, C.M. Estomatite vesicular no Brasil. Tese de Docência Livre. Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1974.
- BRANDÃO, C.T.P. Estomatite vesicular em suínos no Estado do Pará. Dissertação de Mestrado. Instituto de Veterinária, UFRRJ, Itaguaí, R.J. 1989, 77 p.
- CARBREY, E.A. Laboratory diagnosis of vesicular stomatitis. In: *Proc. Int. Conf. Ves. Stomatitis*. Mexico City, Mexico, 24-27 September, 1984, p. 446-456.
- CARTWRIGHT, B., SMALE, C.J., BROWN, F., HULL, R. Model for vesicular stomatitis virus. *J. Virol.*, 10: 256-260, 1972.
- CASTAÑEDA, J., LAVERMAN, L.H., HANSON, R.P. Evaluation of virus neutralization tests and association of indices to cattle resistance. *Proc. Annual Meeting of the USA Livestock Sanitary Association*, 68: 455-468, 1964.
- FEDERER, K.E., BURROWS, R., BROOKSBY, I.B. Vesicular stomatitis virus: the relationship between some strains of the Indiana serotype. *Res. Vet. Sci.*, 8 (1): 103-117, 1967.
- FERREIRA, M.E.V., OBIAGA, J.A., ALONSO, A., SÖNDAHL, M.S. Diagnóstico y tipificación de virus de estomatitis vesicular por técnica de virusneutralización. *Inf. Epid. Mensual PANAF-TOSA*, 11 (5): 58-60, 1979.
- GARCIA PIRAZZI, A.J., CAGGIANO, C.H., ALONSO, A. Estomatitis vesicular: constatación de la enfermedad y aislamiento del virus. *Gac. Vet.*, 28 (187): 85-91, 1966.
- JENICEK, M., CLEROUX, R. *Épidemiologie*. Edisem Inc. Canadá, 1983.
- JONKERS, A.H., SHOPE, R.E., AITKEN, T.H.G., SPENCE, L. Cocal virus, a new agent in Trinidad related to vesicular stomatitis virus, type Indiana. *Am. J. Vet. Res.*, 25: 236-242, 1964.
- KING, H.J. Summary of vesicular stomatitis Hyatsville Md. Emergency Programs Animals Meeting and Plant Health Inspection Service. US Department of Agriculture, 1983, jan. 11-12.
- LEFRANCOIS, L., LYLES, D. Monoclonal antibodies to nonneutralizing and cross-reactive epitopes of Indiana and New Jersey serotypes. *Virology*, 121: 168-174, 1982.
- MARKUS, R. *Elementos de estatística aplicada*. Faculdade de Agronomia. UFRGS. Porto Alegre, Brasil, 1973.
- MATTHEWS, R.E.F. Classification and nomenclature of viruses. *Intervirology*, 17: 1-199, 1982.
- O.I.E. Vesicular stomatitis (A/002). Manual of recommended diagnostic techniques and requirements for biological products for lists A and B diseases. Paris, France. V.II, 1990.
- OZAWA, C.M. Relacionamento sorológico entre os diferentes virus do grupo da estomatite vesicular (VSV). Dissertação de Mestrado. Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 1976. 74 p.
- PANAF-TOSA. Informe epidemiológico de fiebre aftosa y estomatitis vesicular. V.2-22, 1970-1990.
- PUSTIGLIONETTO, L., PINTO, A.A., SUGA, O. Isolamento do vírus, identificação sorológica e levantamento epizootiológico de um surto de estomatite vesicular no Estado de São Paulo. *Arg. Inst. Biol.*, 34 (2): 69-72, 1967.

22. VERNON, S., WEBB, P.A. Recent vesicular stomatitis virus infection detected by immunoglobulin M antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, 22: 582-586, 1985.
23. VOLLER, A., BARLETT, A., BLOWELL, D., CLARK, M., ADAMS, A. The detection of viruses by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Gen. Virol.*, 33: 165-169, 1976.
24. WILKS, C.R., JENNEY, E.W., HOUSE, J.A. Development of an immunoelectroosmophoresis test for the detection and typing of antibodies to vesicular stomatitis viruses. *Can. J. Comp. Med.*, 48: 179-183, 1984.
25. WORKMAN, T., SHEN, D., WOODARD, L., YILMA, T. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine antibodies to vesicular stomatitis virus. *Am. J. Vet. Res.*, 47 (7): 1507-1512, 1986.

### Announcements

#### Meetings of the South American Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease (COSALFA)

*Meetings to discuss matters related to the prevention and control of foot-and-mouth disease are held annually by the member countries of COSALFA. Prior to each meeting, a Seminar on a topic selected during the preceding Seminar is also held.*

1992 - XIX Regular Meeting of COSALFA. April 2 and 3, 1992, Buenos Aires, Argentina  
International Seminar on Local and Zonal Plans with Mobilization of Resources and Community Participation of Eradication of Foot-and-Mouth Disease. March 30 to April 1, 1992.

1993 - XX Regular Meeting of COSALFA. March 25 and 26, 1993, Montevideo, Uruguay  
International Seminar on Foot-and-Mouth Disease Eradication, its Technical and Administrative Bases and its Consequences on the Commercialization of Animals and their Products and by-products. March 22 to 24, 1993.

#### Training activities at the Pan-American Foot-and-Mouth Disease Center (PAHO/WHO)

*Seminars, Courses, In-service training*

##### Laboratory areas

- . Differential diagnoses of vesicular diseases;
- . Production of oil-adjuvant vaccines;
- . Production of monoclonal antibodies;
- . Molecular biology techniques;
- . Care and management of Laboratory Animals.

##### Area of Epidemiology, Infrastructure and Services

- . Epidemiologic surveillance of vesicular diseases;
- . Development of programs of animal health services.

## HETEROGENEIDAD ENTRE TRES CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA, SUBTIPO A<sub>24</sub> CRUZEIRO USADAS PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS

J. J. TRINIDAD<sup>1</sup>, V. MALIRAT<sup>2</sup>, I. E. BERGMANN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires

Avda. Chorroarín 280, Buenos Aires 1427, Argentina

<sup>2</sup>Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS)

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

**Resumen.** Tres cepas del virus de la fiebre aftosa (FA), subtipo A<sub>24</sub> Cruzeiro, usadas para la producción de vacunas, se compararon entre sí por mapeamiento T<sub>1</sub> (*fingerprinting*) y por electroforesis en geles de poliacrilamida de las proteínas de la cápside. A pesar de resultar indistinguibles por ensayos de fijación de complemento, el mapeamiento T<sub>1</sub> mostró variaciones genómicas entre ellas, que alcanzaron valores de hasta 4.0%. Estas diferencias se reflejaron en la movilidad electroforética de la principal proteína inmunogénica VP<sub>1</sub>. En una de las cepas, los padrones de migración de las proteínas estructurales VP<sub>2</sub> y VP<sub>3</sub> también fueron afectados. Los resultados ilustran la diversidad genómica potencial entre cepas usadas para la producción de vacunas contra la FA.

El control de la fiebre aftosa (FA) en regiones endémicas se basa, en parte, en la inmunización sistemática con vacunas inactivadas químicamente. A pesar de ser efectivas, su producción y uso se ven afectados por la extensa diversidad antigénica del virus. Existen 7 tipos serológicamente distinguibles, distribuidos en forma no uniforme en el mundo (21). En la mayoría de las regiones, vacunas para dos o más serotipos son usadas de rutina en la profilaxis.

Cada serotipo comprende un número siempre creciente de subtipos, los que surgen con mayor frecuencia dentro del grupo A (20, 23). No todas las variantes dentro de un subtipo proporcionan protección cruzada. Contrariamente, vacunas derivadas de ciertas cepas pueden proteger contra virus pertenecientes a más de un subtipo (11, 19). Esto ilustra la necesidad de seleccionar cepas vacu-

nales que sean capaces de neutralizar efectivamente un rango de muestras de campo tan amplio como sea posible. De hecho, generalmente se acepta que nuevas variantes antigénicas que surgen en el campo pueden controlarse usando vacunas que inducen anticuerpos con amplio rango de reactividad.

Una vez que la variante de la cepa vacunal adecuada ha sido seleccionada, la preocupación mayor es asegurar su estabilidad durante la producción de la vacuna. Este proceso generalmente involucra múltiples ciclos de crecimiento en cultivos celulares. Sin embargo, durante el pasaje del virus en líneas celulares se ha demostrado variación potencial del VFA. Así, diversos autores (5, 10, 15), observaron variantes de placa asociadas con cambios antigénicos luego de pasajes en células de riñón de cría de hamster (BHK), mientras que Sobrino y cols. (25), describieron el surgimiento de variantes genómicas.

Debido a que la diversidad es en sí misma el resultado de la variación genética (revisión en Domingo y cols.8), la aplicación de métodos moleculares constituye una valiosa herramienta

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



para estudios de variabilidad, ya que éstos son capaces de identificar mutaciones genómicas que pueden llevar a cambios antigénicos.

Para obtener información preliminar acerca del impacto que la diversidad del VFA tiene en cepas vacunales individuales, fueron analizados los mapas  $T_1$  del ARN genómico, y la movilidad electroforética en geles de poliacrilamida (PAGE) de las proteínas estructurales, de tres cepas vacunales subtipo  $A_{24}$  Cruzeiro. Como muestran los resultados, ha sido posible establecer diferencias genéticas sustanciales entre dos de las cepas estudiadas.

## MATERIALES Y METODOS

### Células y virus

En este estudio fueron usadas tres cepas virales pertenecientes al subtipo  $A_{24}$  Cruzeiro, y designadas  $A_{24}$  Cruzeiro Brasil 1/55 ( $A_{24}$  1/55),  $A_{24}$  Cruzeiro Brasil 2/55 ( $A_{24}$  2/55), y  $A_{24}$  Cruzeiro Brasil 3/55 ( $A_{24}$  3/55). Las dos primeras, han sido usadas en la producción de vacunas en el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, siendo la cepa  $A_{24}$  1/55 la que se encuentra actualmente en uso. La cepa  $A_{24}$  3/55 fue obtenida del Animal Virus Research Institute, Pirbright, Reino Unido. Los virus fueron pasados en cultivos de monocapas de células BHK-21, clon 13, el mínimo número de veces requerido para los estudios.

### Aislamiento del ARN y mapeamiento $T_1$

El marcado radioactivo del ARN del VFA con  $^{32}\text{P}$  y la extracción del ARN citoplasmático fueron llevados a cabo como fuera descrito anteriormente (1). El método usado para la separación de los oligonucleótidos resistentes a  $T_1$  fue una modificación de técnicas anteriores y se realizó como fuera descrito (2).

### Electroforesis en geles de poliacrilamida de las proteínas estructurales de los virus

Las proteínas estructurales fueron preparadas para cada cepa, mediante infección de monocapas

de células BHK-21 a una multiplicidad de infección de 10 UFP/célula. Luego de registrado efecto citopático completo, el medio, congelado y clarificado, fue agitado con triclorotrifluoretano al 10% y centrifugado a 10.000 x g durante 15 min a 4 °C, y el sobrenadante ajustado a una concentración final de tampón NET (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA).

Los virus se concentraron por centrifugación a través de un colchón de sacarosa al 20% en tampón NET, a 95.000 x g, 3 h a 4°C. El *pellet* fue resuspendido en el mismo tampón, y seguidamente purificado por sedimentación en gradiente de sacarosa, de acuerdo con Denoya y cols., (6).

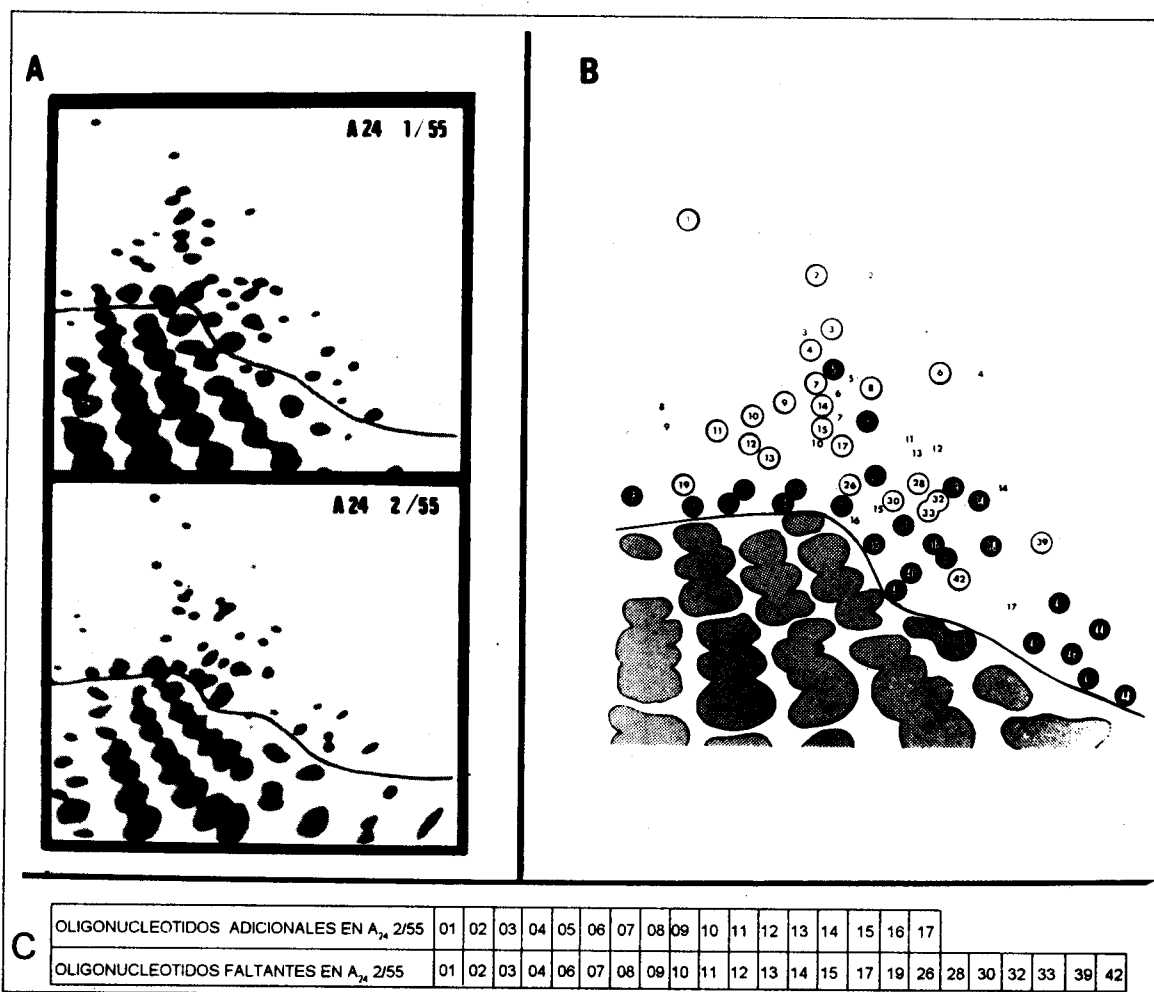
Los viriones (2 µg) fueron desintegrados por tratamiento a 90°C durante 2 min en un tampón conteniendo 80 mM Tris-HCl, pH 6,8, 10% dodecil sulfato de sodio (SDS), 8M urea, 1,2 M 2-mercaptoetanol, 20% glicerol y 0,02% de azul de bromofenol. Las proteínas fueron resueltas por electroforesis en SDS-12,5% PAGE, (14) conteniendo urea 8M (SDS-urea-PAGE).

## RESULTADOS

### *Fingerprinting* $T_1$ de los ARNs de las cepas vacunales $A_{24}$

La Figura 1A muestra los mapas  $T_1$  de los ARNs de las cepas vacunales  $A_{24}$  1/55 y  $A_{24}$  2/55. Una representación esquemática de las diferencias entre las dos cepas se resume en la Fig. 1B. Los oligonucleótidos adicionales y faltantes se catalogaron y los resultados se presentan en la parte C de la figura. En forma similar, se presentan las comparaciones entre las cepas  $A_{24}$  1/55 y  $A_{24}$  3/55, así como entre las cepas  $A_{24}$  2/55 y  $A_{24}$  3/55 en las Figs. 2 y 3, respectivamente.

A pesar de que los tres virus son indistinguibles por ensayos de fijación de complemento, cada ARN posee oligonucleótidos únicos, y el número de cambios totales de oligonucleótidos estimado como fuera descrito por Nakajima y col. (16) varió entre 2,5 (entre las cepas  $A_{24}$  1/55 y  $A_{24}$  3/55) y 32,5 (entre las cepas  $A_{24}$  2/55 y  $A_{24}$  3/55). Estas diferencias representan variaciones en 0,3-4,0% de nucleótidos en el genoma (Cuadro 1).



**FIGURA 1.** Comparación de los *fingerprints* de los oligonucleótidos resistentes a T<sub>1</sub> de los ARNs de los VFA A<sub>24</sub> 1/55 y A<sub>24</sub> 2/55.  
**A.** Autoradiografía de los oligonucleótidos marcados con <sup>32</sup>P y resistentes a ribonucleasa T<sub>1</sub> de los ARNs indicados.  
**B.** Análisis comparativo de los *fingerprints* de los virus indicados en la figura. La identidad de manchas (oligonucleótidos) en las diferentes muestras fue confirmada, cuando fue preciso, por medio de co-electroforesis de mezclas conteniendo cantidades equivalentes de digestos de ARNasa T<sub>1</sub>. La línea negra marca un límite arbitrario entre los oligonucleótidos pequeños y los grandes, éstos últimos (48 en la cepa A<sub>24</sub> 1/55) usados en las comparaciones. Códigos para el análisis comparativo: los círculos negros numerados corresponden a oligonucleótidos presentes en ambas cepas. Los números circulares en fondo blanco y los números no circulares representan oligonucleótidos presentes solamente en la cepa A<sub>24</sub> 1/55 ó A<sub>24</sub> 2/55, respectivamente.  
**C.** Catálogo de oligonucleótidos adicionales y faltantes de la cepa A<sub>24</sub> 2/55 con respecto a la A<sub>24</sub> 1/55. Solo se incluyen aquellos en los que se observaron diferencias.

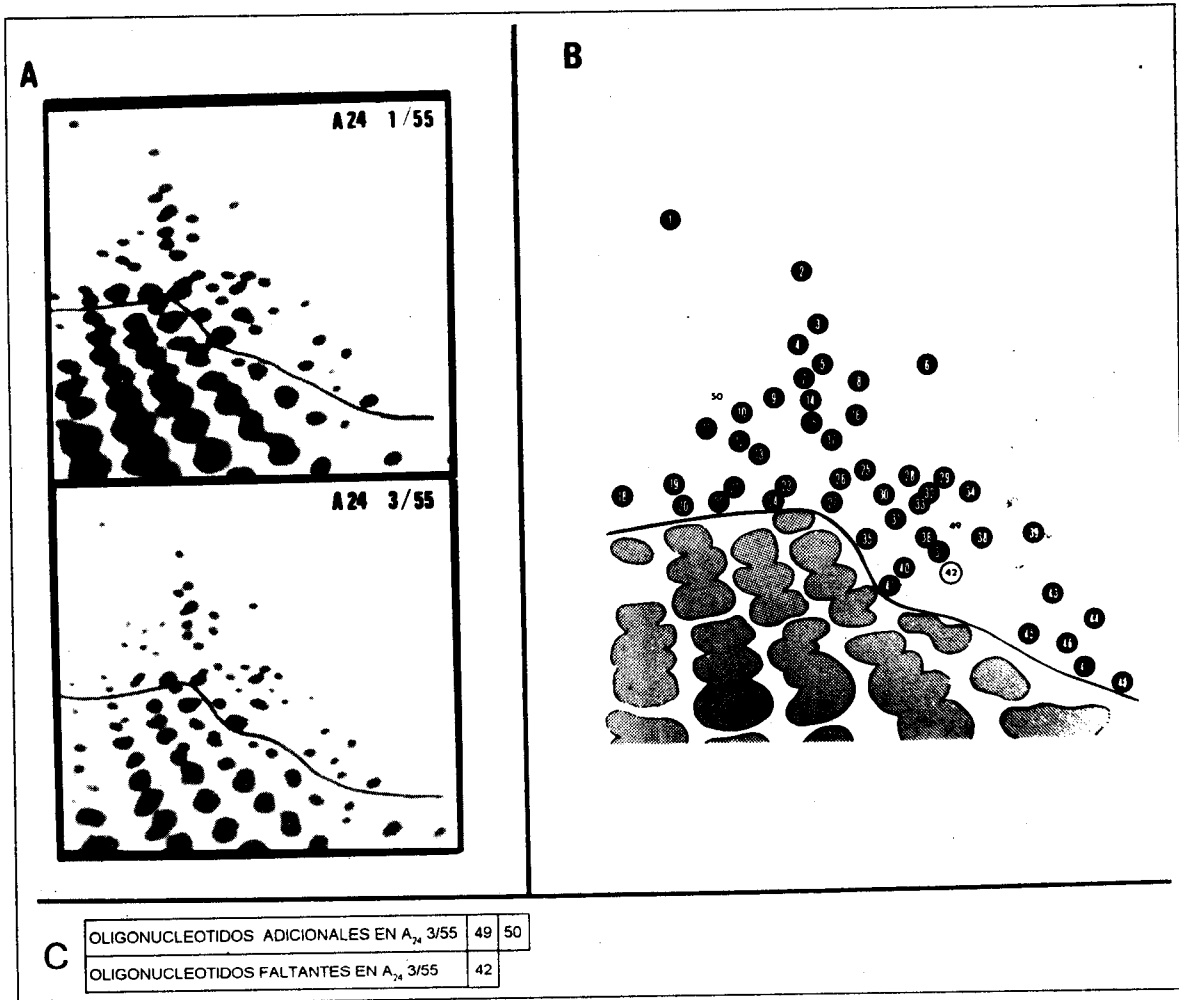


FIGURA 2. Comparación de los *fingerprints* de los oligonucleótidos resistentes a T<sub>1</sub> de los ARNs de las cepas de VFA A<sub>24</sub> 1/55 y A<sub>24</sub> 3/55. Las especificaciones son como en la Fig. 1.

A. Autoradiografía de los oligonucleótidos marcados con <sup>32</sup>P y resistentes a ribonucleasa T<sub>1</sub> de los ARNs indicados.

B. Los números circulados en fondo blanco indican a oligonucleótidos presentes solamente en la cepa A<sub>24</sub> 1/55; los números sin circular denotan oligonucleótidos pertenecientes solamente a la cepa A<sub>24</sub> 3/55.

C. Catálogo de oligonucleótidos adicionales y faltantes de la cepa A<sub>24</sub> 3/55 con respecto a la cepa A<sub>24</sub> 1/55.

En los virus  $A_{24}$  1/55 y  $A_{24}$  3/55, los polipéptidos estructurales  $VP_2$  (1B) y  $VP_3$  (1C) mostraron padrones de migración indistinguibles. Sin embargo, se observó una movilidad electroforética aumentada de estas proteínas, cuando las cepas mencionadas se compararon con la  $A_{24}$  2/55.

## DISCUSION

Los resultados presentados en este trabajo proporcionan evidencia de la heterogeneidad entre cepas del VFA subtipo  $A_{24}$  usadas en la producción de vacunas. Esta variación genética afectó a la proteína inmunogénica  $VP_1$ , como muestran los resultados de SDS-urea-PAGE (Fig. 4), y de secuenciamiento de nucleótidos (manuscrito en preparación).

A pesar de que no se dispone de información detallada acerca de los pasajes en cultivo de células a que fueron sometidas estas cepas vacunales, los cambios observados pueden ser atribuidos a sus diferentes historias de crecimiento.

De hecho, se ha demostrado el surgimiento de variantes genéticas con propiedades antigénicas y/o inmunogénicas alteradas durante la replicación del VFA en cultivos celulares (12, 13, 24, 25) inclusive luego de una extensiva purificación por plaqueo (27), o en ausencia de anticuerpos específicos contra el virus (7).

Asimismo, se ha descrito variación genética como el resultado de la adaptación del VFA a diferentes sistemas celulares susceptibles. Rowlands y cols. (22) informaron que un número de variantes de la región de  $VP_1$ , reconocida como inmunogénica, eran seleccionadas luego de un único pasaje en células BHK de una cepa de VFA, subtipo  $A_{12}$ , derivada de bovino. También se describieron (26) variaciones en esta región, entre distintos clones de cADN de los subtipos  $A_3$  y  $A_{24}$ . Bolwell y col. (4) mostraron la selección de una variante antigénica del VFA,  $A_{22}$  Iraq 24/64, que contiene tres diferencias de codificación de la proteína de la cápside  $VP_2$ , luego de la adaptación del virus de cultivo celular en monocapa a suspensión. La cepa adaptada a monocapa inducía anticuerpos que neutralizaban efectivamente un rango más amplio de variantes de campo, que la adaptada a suspensión.

CUADRO 1. Comparaciones apareadas entre las tres cepas.

	$A_{24}$ 1/55	$A_{24}$ 2/55	$A_{24}$ 3/55
$A_{24}$ 1/55	-	31,5	2,5
$A_{24}$ 2/55	3,8	-	32,5
$A_{24}$ 3/55	0,3	4,0	-

Nota: Cambios totales de oligonucleótidos (arriba a derecha) estimados como fuera descrito por Nakajima y cols., (16), y porcentaje de variación calculado suponiendo que se analiza el 10% del genoma, y que los oligonucleótidos grandes son representativos del genoma completo (abajo a izquierda).

Consecuentemente, y concordando con los resultados presentados en este trabajo, las cepas vacunales pueden mostrar diferencias entre lotes, de acuerdo a su historia de pasajes. La heterogeneidad entre preparaciones virales usadas para la producción de vacunas en España también ha sido informada (9).

Resultados previos de Cowan y cols., (5) sugirieron que la fijación de cambios antigénicos relevantes puede impedir la inmunogenicidad esperada de las vacunas. Estos autores asociaron los cambios antigénicos ocurridos al cultivar VFA en células BHK, con una disminuída habilidad para inmunizar contra el virus parental. En contraposición, Parry y cols. (17), no encontraron correlación entre variantes antigénicas y aparente desempeño en pruebas de potencia, de 18 cepas vacunales adaptadas a células BHK en suspensión. Se están continuando los estudios para establecer si las modificaciones observadas en las tres cepas vacunales analizadas en este trabajo, afectaron su inmunogenicidad.

A pesar de que la heterogeneidad es inherente a las poblaciones de VFA, el surgimiento de nuevas variantes antigénicas durante la producción de vacunas podría minimizarse reduciendo el número de ciclos de crecimiento viral, en un sistema *seed lot*. Sin embargo, en el caso del procedimiento de Frenkel, esto no es practicable y se ha registrado variación luego de los continuos pasajes que son inherentes al sistema (18).



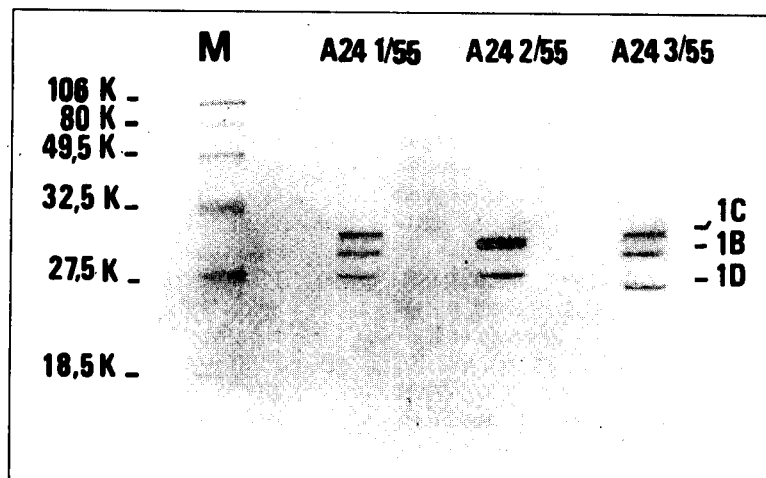


FIGURA 4. Análisis de los polipéptidos estructurales de las cepas estudiadas en SDS-urea-PAGE. M: Marcadores de peso molecular.

Debe notarse que, aunque ni los mapas  $T_1$  ni el análisis por SDS-urea-PAGE pueden correlacionarse con inmunogenicidad y/o protección *in vivo*, resultaron herramientas útiles para un control preliminar de la estabilidad de la cepa vacunal. Adicionalmente, la caracterización molecular permite una precisa correlación entre cepas vacunales y los virus que surgen en el campo (3).

Desde un punto de vista práctico, estos estudios enfatizan la necesidad de controlar los *stocks* de virus usados para la producción (y el desafío) de las vacunas. Esto es particularmente importante en vista de la nueva tendencia de seleccionar cepas vacunales de amplio espectro (incluso para serotipos altamente lábiles como el A), para su uso en regiones geográficas extensas, como Sudamérica.

#### RECONOCIMIENTOS

Los autores desean agradecer a Pedro Jeovah Vieira Pereira y Maria Aparecida Affonso Boller por la excelente asistencia técnica.

El autor principal presentó este trabajo en cumplimiento parcial de los requisitos para el título de *Magister* en Salud Animal de la Universidad de Buenos Aires.

#### REFERENCIAS

1. AUGÉ DE MELLO, P., OLASCOAGA, R.C., COSTA GIOMI, M.P., ALONSO FERNANDEZ, A., SCODELLER, E.A., LA TORRE, J.L., BERGMANN, I.E. RNA fingerprinting of South American prototype aphthovirus strains. *Vaccine*, 4: 105-110, 1986.
2. BERGMANN, I.E., TIRABOSCHI, B.H., BOLLER, M.A.A., MALIRAT, V., PEREIRA, P.J.V., AUGÉ DE MELLO, P. Development of a more rapid and simple procedure for two-dimensional oligonucleotide analysis of foot-and-mouth disease virus: RNA *minifingerprinting*. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 55: 39-42, 1989.
3. BERGMANN, I.E., TIRABOSCHI, B., MAZZUCA, G., FERNANDEZ, E., MICHAIOFF, C.A., SCODELLER, E.A., LA TORRE, J.L. 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.
4. BOLWELL, C., BROWN, A.L., BARNETT, P.V., CAMPBELL, R.O., CLARKE, B.E., PARRY, N.R. Host cell selection of antigenic variants of foot-and-mouth disease virus. *J. Gen. Virol.*, 70: 45-57, 1989.
5. COWAN, K.M., EROL, N., WHITEHEAD, A.P. Heterogeneity of type Asia 1 foot-and-mouth disease virus and BHK-21 cells and the relationship to vaccine preparation. *Bull. Off. int. Epiz.*, 81: 1271-1289, 1974.

6. DENOYA, C.D., SCODELLER, E.A., GIMÉNEZ, B.H., VASQUEZ, C., LA TORRE, J.L. Foot-and-mouth disease virus. Stability of its ribonucleic acid. *Virology*, 84: 230-235, 1978.
7. DIEZ, J., MATEU, M.G., DOMINGO, E. Selection of antigenic variants of foot-and-mouth disease virus in the absence of antibodies, as revealed by an "in situ" assay. *J. Gen. Virol.*, 70: 3281-3289, 1989.
8. DOMINGO, E., MATEU, M.G., MARTINEZ, M.A., DOPAZO, J., MOYA, SOBRINO, F. Genetic variability and antigenic diversity of foot-and-mouth disease virus. In: KURSTAK, E., MARUSYK, R.G., MURPHY, F.A., VAN REGENMORTEL, M.H.V. (Eds.). *Applied Virology Research*. New York, Plenum, 1990, pp. 233-266.
9. GONZALEZ, M., MATEU, M.G., MARTINEZ, M.A., CARRILLO, C., SOBRINO, F. Comparison of capsid protein VP1 of the viruses used for the production and challenge of foot-and-mouth disease vaccines in Spain. *Vaccine*, 10: 731-734, 1992.
10. HARRIS, T.J.R., BROWN, F. Biochemical analysis of a virulent and an avirulent strain of foot-and-mouth disease virus. *J. Gen. Virol.*, 34: 87-105, 1977.
11. HYSLOP, N. St. G., DAVIE, J., CARTER, S.P. Antigenic differences between strains of foot-and-mouth disease virus of type SAT 1. *J. Hyg.*, 61: 217-230, 1963.
12. LA TORRE, J.C. de, DAVILA, M., SOBRINO, F., ORTIN, J., DOMINGO, E. Establishment of cell lines persistently infected with foot-and-mouth disease virus. *Virology*, 45: 24-35, 1985.
13. LA TORRE, J.C. de, MARTINEZ-SALAS, E., DIEZ, J., VILLAVARDE, A., GEBAUER, F., ROCHA, E., DAVILA, M., DOMINGO, E. Co-evolution of cells and viruses in a persistent infection of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J. Virol.*, 62: 2050-2058, 1988.
14. LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685, 1970.
15. MELOEN, M. Localization on foot-and-mouth disease (FMDV) of an antigenic deficiency induced by passage in BHK cells. *Arch. Virol.*, 51: 99-306, 1976.
16. NAKAJIMA, K., DESSELBERGER, U., PALESE, P. Recent human influenza A (H1N1) viruses are closely related genetically to strains isolated in 1950. *Nature*, 274: 334-339, 1978.
17. PARRY, N.R., RWEYEMAMU, M.M., PAY, T.W.F. Studies of plaque variants of foot-and-mouth disease vaccine virus. *Bull. Off. Int. Epiz.*, 89: 929-943, 1978.
18. PAY, T.W.F. Variation in foot-and-mouth disease: application to vaccination. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 2 (3): 701-723, 1983.
19. PEREIRA, H.G. Subtyping of foot-and-mouth disease virus. *Dev. Biol. Stand.*, 35: 167-174, 1977.
20. PEREIRA, H.G. Antigenic variation in relation to epidemiology and control of foot-and-mouth disease. *Br. Vet. J.*, 138: 58-62, 1978.
21. PEREIRA, H.G. Foot-and-mouth disease. In: GIBBS, E.P.J. (Ed.). *Virus disease of food Animals*. New York, Academic Press, 1981. v. 2. pp. 333-363.
22. ROWLANDS, D.J., CLARKE, B.E., CARROLL, A.R., BROWN, F., NICHOLSON, B.H., BITTLE, J.L., HOUGHTEN, R.A., LERVER, R.A. Chemical basis of antigenic variation in foot-and-mouth disease. *Nature*, 306: 694-697, 1983.
23. RWEYEMAMU, M.M. Antigenic variation in foot-and-mouth disease: studies based on the virus neutralization reaction. *J. Biol. Stand.*, 12: 323-337, 1984.
24. SAIZ, J.C., GONZALEZ, M.J., MORGAN, D.O., CARD, J.L., SOBRINO, F., MOORE, D.M. Antigenic comparison of different foot-and-mouth disease virus types using monoclonal antibodies defining multiple neutralizing epitopes on FMDV A5 subtypes. *Virus Res.*, 13: 45-60, 1989.
25. SOBRINO, F., DAVILA, M., ORTIN, J., DOMINGO, E. Multiple genetic variants arise in the course of replication of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *Virology*, 128: 310-318, 1983.
26. WEDDELL, G.N., YANSURA, D.G., DOWBENKO, D.J., HOATLIN, M.E., GRUBMAN, M.J., MOORE, D.M., KLEID, D.G. Sequence variation in the gene for the immunogenic capsid protein VP<sub>1</sub> of foot-and-mouth disease virus type A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 2618-2622, 1985.
27. XIE, Q.C., McCAHON, D., CROWTHER, J.R., BELSHAM, G.J., McCULLOUGH, K.C. Neutralization of foot-and-mouth disease virus can be mediated through any of at least three separate antigenic sites. *J. Gen. Virol.*, 68: 1637-1647, 1987.

## HETEROGENEITY AMONG THREE FOOT-AND-MOUTH DISEASE SUBTYPE A<sub>24</sub> CRUZEIRO VIRUS STRAINS USED FOR THE PRODUCTION OF VACCINES

J. J. TRINIDAD<sup>1</sup>, V. MALIRAT<sup>2</sup>, I. E. BERGMANN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires  
Avda. Chorroarín 280, Buenos Aires 1427, Argentina  
Pan-American Foot-and-Mouth Disease Center (PAHO/WHO)  
P.O. Box 589, 20001-970 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

**Abstract.** Three foot-and-mouth disease (FMD) subtype A<sub>24</sub> Cruzeiro virus strains used for the production of vaccines were compared with each other by T<sub>1</sub> mapping (fingerprinting) and by polyacrylamide gel electrophoresis of the capsid proteins. Although indistinguishable by complement fixation tests, genomic variations were found among them by T<sub>1</sub> mapping, reaching values of up to 4.0%. These differences were reflected in the electrophoretic mobility of the main immunogenic protein VP<sub>1</sub>. In one of the strains, migration patterns of structural proteins VP<sub>2</sub> and VP<sub>3</sub> were also affected. The results illustrate the potential genomic diversity of strains used for production of FMD vaccines.

Control of foot-and-mouth disease (FMD) in endemic regions is partly based on systematic immunization with chemically inactivated vaccines. Although currently effective, their production and use are affected by the extensive antigenic diversity of the virus. There are seven distinct serologic types, distributed unevenly throughout the world (21). In most areas, vaccines to two or more serotypes are used routinely in prophylaxis.

Each serotype comprises an ever-increasing number of subtypes, which arise more frequently in the A group (20, 23). Not all variants within a subtype provide cross-protection. Conversely, vaccines derived from some strains can protect against viruses from more than one subtype (11, 19). This illustrates the need to select vaccine strains which are capable of neutralizing effectively as broad a range of field samples as possible. In fact,

it is generally accepted that new antigenic variants emerging in the field may be brought under control by using vaccines which induce broadly reactive antibodies.

Once an adequate vaccine variant strain has been selected, a major concern is to ensure its stability during vaccine production. This process usually involves multiple growth cycles in cell culture. However, during the passage of the virus in cell lines, the potential for FMDV diversity has been demonstrated. Thus, various authors (5, 10, 15) observed plaque variants associated with antigenic shifts following passages in baby hamster kidney (BHK) cells, while Sobrino et al. (25), described the emergence of genomic variants.

Since diversity is in itself the result of genetic variation (reviewed by Domingo et al. 8), the application of molecular methods constitutes a valuable tool for variability studies, as they can identify genomic mutations which may lead to antigenic changes.

To obtain preliminary information on the impact that FMDV diversity has on individual

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



vaccine strains, the  $T_1$  maps of genomic RNA and the electrophoretic mobility on polyacrylamide gels (PAGE) of the structural proteins of three subtype  $A_{24}$  Cruzeiro vaccine strains were analyzed. As shown by the results, it was possible to establish substantial genetic differences between two of the strains studied.

## MATERIALS AND METHODS

### Cells and viruses

Three viral strains belonging to subtype  $A_{24}$  Cruzeiro and designated  $A_{24}$  Cruzeiro Brasil 1/55 ( $A_{24}$  1/55),  $A_{24}$  Cruzeiro Brasil 2/55 ( $A_{24}$  2/55), and  $A_{24}$  Cruzeiro Brasil 3/55 ( $A_{24}$  3/55) were used in this study. The former two have been used for vaccine production at the Pan American Foot-and-Mouth Disease Center, of which strain  $A_{24}$  1/55 is currently in use. Strain  $A_{24}$  3/55 was obtained from the Animal Virus Research Institute, Pirbright, United Kingdom. Viruses were passaged in BHK-21, clone 13 cell monolayer cultures to the minimal extent needed for the studies.

### RNA isolation and $T_1$ fingerprinting

$^{32}\text{P}$  labeling of FMDV RNA and extraction of cytoplasmic RNA were carried out as described previously (1). The method of separation of  $T_1$  oligonucleotides used was a modification of earlier techniques, and was performed as described (2).

### Polyacrylamide gel electrophoresis of viral structural proteins

Structural proteins were prepared for each strain by infection of BHK-21 cell monolayers at a multiplicity of infection of 10 PFU/cell. After complete cytopathic effect was recorded, the chilled, clarified media was shaken with 10% trichlorofluoroethane and centrifuged at 10,000 x g for 15 min at 4°C, and the supernatant adjusted to a final concentration of NET buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA).

Viruses were concentrated by centrifugation through a cushion of 20% sucrose in NET buffer, at 95,000 x g, 3h at 4°C. The pellet was resuspended in the same buffer, and further purified by sucrose gradient sedimentation according to Denoya et al. (6).

Virions (2  $\mu\text{g}$ ) were disrupted by treatment at 90°C for 2 min in a buffer containing 80 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% sodium dodecyl sulphate (SDS), 8M urea, 1.2 M 2-mercaptoethanol, 20% glycerol and 0.02% bromophenol blue. Proteins were resolved by electrophoresis on SDS-12.5% PAGE (14), containing 8M urea (SDS-urea-PAGE).

## RESULTS

### $T_1$ fingerprinting of RNAs from $A_{24}$ vaccine strains

Figure 1A shows the  $T_1$  maps from the RNAs of vaccine strains  $A_{24}$  1/55 and  $A_{24}$  2/55. A schematic representation of the differences between the two strains is summarized in Fig. 1B. Missing and additional spots were catalogued and the results are presented in part C of the figure. Similarly, comparisons between strains  $A_{24}$  1/55 and  $A_{24}$  3/55, as well as between strains  $A_{24}$  2/55 and  $A_{24}$  3/55 are presented in Figs. 2 and 3, respectively.

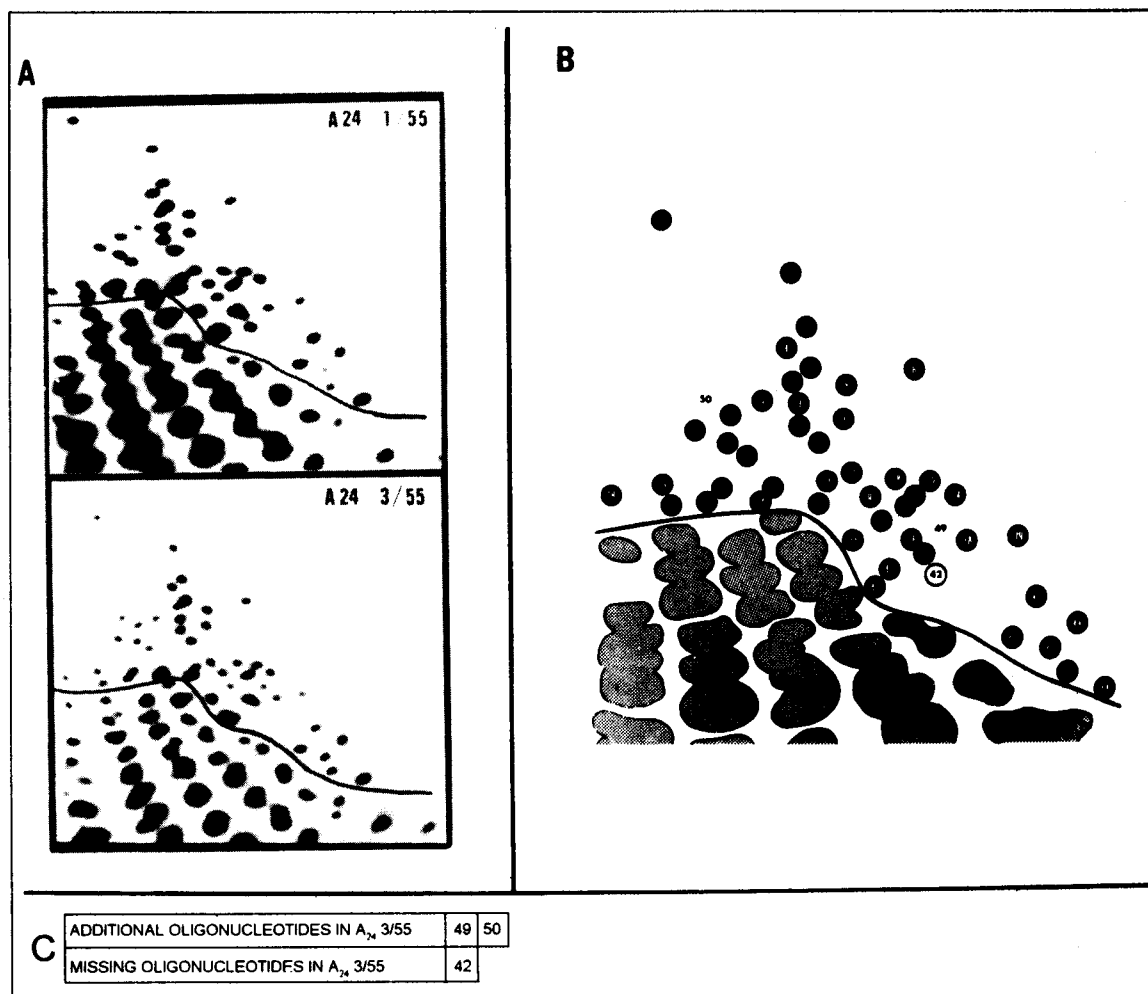
Although the three viruses were indistinguishable by complement fixation tests, each RNA had unique oligonucleotides, and the number of total spot changes estimated as described by Nakajima et al. (16) ranged from 2.5 (between  $A_{24}$  1/55 and  $A_{24}$  3/55) to 32.5 (between  $A_{24}$  2/55 and  $A_{24}$  3/55). These differences represent variations in 0.3-4.0% of the genomic nucleotides (Table 1).

### Analysis of structural polypeptides on SDS-urea-PAGE

To establish whether the genomic changes were reflected in the structural proteins, viral purified polypeptides were resolved on SDS-urea-PAGE.

As can be seen in Fig. 4, differences in the electrophoretic mobility of capsid polypeptide VP<sub>1</sub> (1D) were detected in all three strains.





**FIGURE 2.** Comparison of T<sub>1</sub> oligonucleotide fingerprints of FMDV RNAs A<sub>24</sub> 1/55 and A<sub>24</sub> 3/55. Legends are as in Fig. 1.  
**A.** Autoradiographs of the ribonuclease T<sub>1</sub> <sup>32</sup>P-labeled oligonucleotide fingerprints of the indicated RNAs.  
**B.** Circled numbers indicate spots present only in sample A<sub>24</sub> 1/55; uncircled numbers denote spots belonging only to strain A<sub>24</sub> 3/55.  
**C.** Catalog of missing and additional spots of strain A<sub>24</sub> 3/55 with respect to strain A<sub>24</sub> 1/55.

Structural polypeptides VP2 (1B) and VP<sub>3</sub> (1C) showed indistinguishable migration patterns in viruses A<sub>24</sub> 1/55 and A<sub>24</sub> 3/55. However, an increased electrophoretic mobility of these proteins was observed when the mentioned strains were compared with strain A<sub>24</sub> 2/55.

## DISCUSSION

The results presented herein provide evidence of heterogeneity among FMDV subtype A<sub>24</sub> virus strains, used for the production of vaccines. This genetic variation affected the immunogenic protein VP<sub>1</sub>, as shown by the results of SDS-urea-PAGE (Fig. 4) and nucleotide sequencing (manuscript in preparation).

Although detailed information on the cell culture passages undergone by these vaccine strains is not available, changes observed may be attributed to their different growth histories.

In fact, the emergence of genetic variants with altered antigenic and/or immunogenic properties during replication of FMDV in cell culture has been demonstrated (12, 13, 24, 25), even after extensive plaque purification (27), or in the absence of specific antibodies against the virus (7).

Furthermore, genetic variation has been described as a result of adaptation of FMDV to different susceptible cell systems. Rowlands et al (22) reported that a number of variants within the known immunogenic region of VP<sub>1</sub> were selected after a single passage of bovine-derived FMDV subtype A<sub>12</sub> in BHK cells. Variations in this region have also been described among different cDNA clones of the A<sub>5</sub> and A<sub>24</sub> subtypes (26). Bolwell et al (4) showed that an antigenic variant of FMDV, A<sub>22</sub> Iraq 24/64, containing three coding differences in capsid protein VP<sub>2</sub>, was selected upon adaptation of a virus sample from monolayer to suspension cell cultures. The monolayer-adapted strain induced antibodies which neutralized effectively a wider range of field variants than the suspension-adapted virus.

TABLE 1. Pairwise comparisons among the three strain.

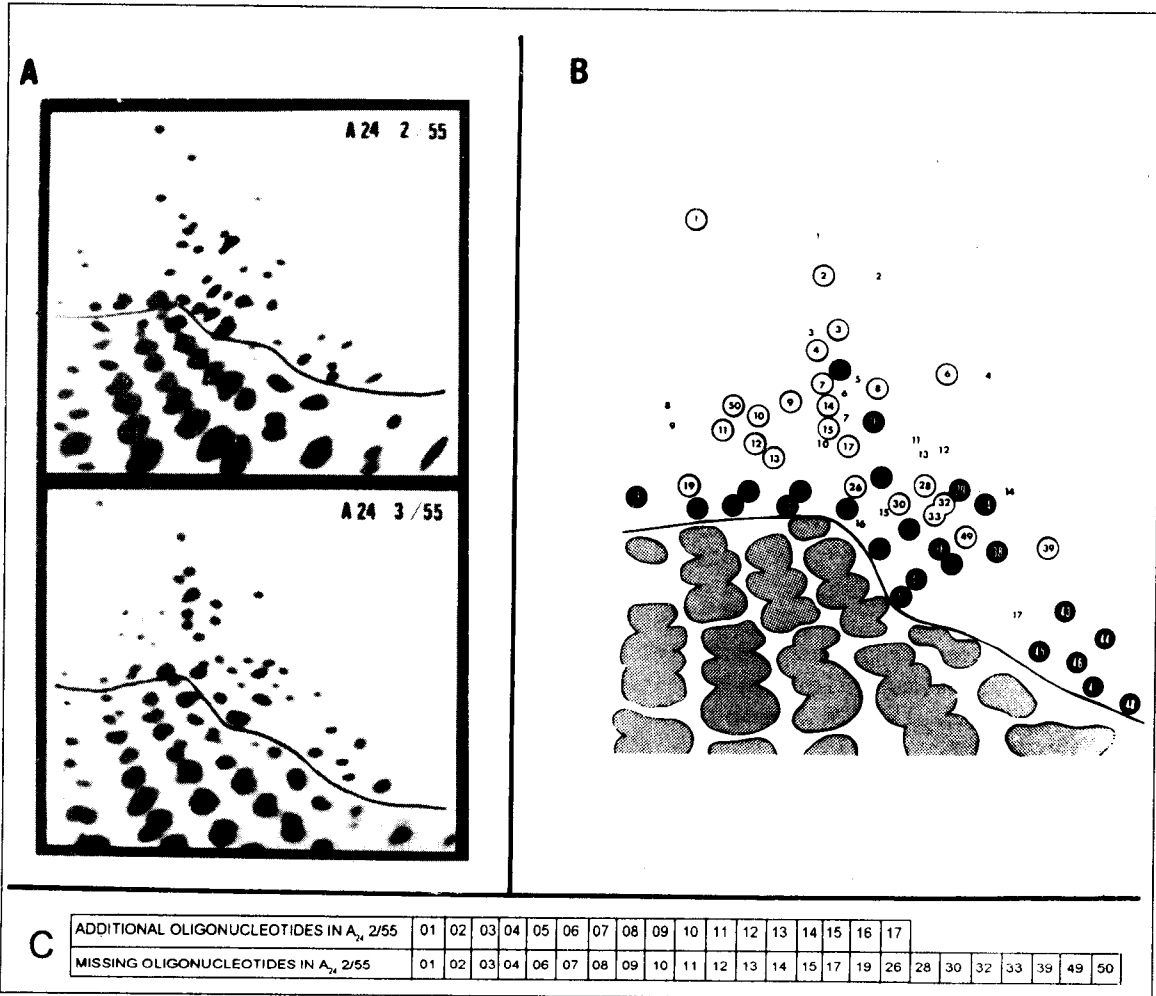
	A <sub>24</sub> 1/55	A <sub>24</sub> 2/55	A <sub>24</sub> 3/55
A <sub>24</sub> 1/55	-	31,5	2,5
A <sub>24</sub> 2/55	3,8	-	32,5
A <sub>24</sub> 3/55	0,3	4,0	-

Note: Total spot changes (upper right) estimated as described in Nakajima et al., 1978, and percentage of variation calculated assuming that 10% of the genome is analyzed, and that the large oligonucleotides are representative of the whole genome (lower left).

Consequently, and in agreement with the results presented herein, vaccine strains may display differences between lots, according to their passage history. Heterogeneity among viral preparations used for vaccine production in Spain was also reported (9).

Early results by Cowan et al. (5) suggested that the fixation of relevant antigenic changes can impair the expected immunogenicity of vaccines. These authors were able to associate the antigenic shifts occurring by culturing FMDV in BHK cells, with a reduced ability to immunize against the parental virus. In contrast, Parry et al. (17) found no correlation between antigenic variants and apparent performance in potency tests, of 18 BHK suspension cell-adapted vaccine strains. Studies are in progress to establish whether the modifications observed in the three vaccine strains analyzed here, affected their immunogenicity.

Even when heterogeneity is inherent to FMDV populations, the emergence of new antigenic variants during vaccine production could be minimized by reducing the number of viral growth cycles in a seed lot system. However, in the case of Frenkel's procedure, this is not practicable and variation has been reported after the continuous passage that is inherent in the system (18).



**FIGURE 3.** Comparison of T<sub>1</sub> oligonucleotide fingerprints of FMDV RNAs A<sub>24</sub> 2/55 and A<sub>24</sub> 3/55. Legends are as in Fig. 1.  
**A.** Autoradiographs of the ribonuclease T<sub>1</sub> <sup>32</sup>P-labeled oligonucleotide fingerprints of the indicated RNAs.  
**B.** Circled numbers indicate spots present only in sample A<sub>24</sub> 3/55; uncircled numbers denote spots belonging only to strain A<sub>24</sub> 2/55.  
**C.** Catalog of missing and additional spots of strain A<sub>24</sub> 2/55 with respect to strain A<sub>24</sub> 3/55.

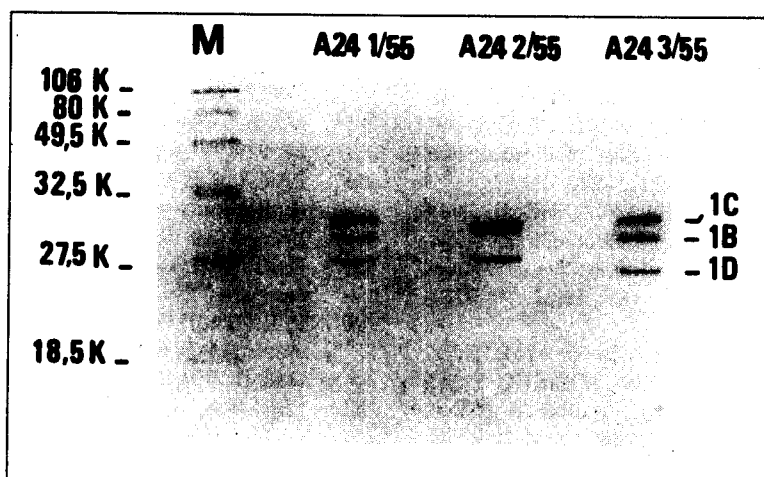


FIGURE 4. Analysis on SDS-urea-PAGE gels of viral structural polypeptides of the studied strains. M: Molecular weight markers.

From a practical standpoint, these studies emphasize the need to test the virus stocks used for production (and challenge) of vaccines. This is particularly important, in view of the modern tendency of selecting broad spectrum vaccine strains (even for highly labile serotypes such as A), for use throughout a large geographical region such as South America.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank Pedro Jeovah Vieira Pereira and Maria Aparecida Affonso Boller, for their excellent technical assistance.

This work was presented by the senior author in partial fulfillment of the requirement for the degree of *Magister* in Animal Health of the University of Buenos Aires

#### REFERENCES

1. AUGÉ DE MELLO, P., OLASCOAGA, R.C., COSTA GIOMI, M.P., ALONSO FERNANDEZ, A., SCODELLER, E.A., LA TORRE, J.L., BERGMANN, I.E. RNA fingerprinting of South American prototype aphthovirus strains. *Vaccine*, 4: 105-110, 1986.
2. BERGMANN, I.E., TIRABOSCHI, B.H., BOLLER, M.A.A., MALIRAT, V., PEREIRA, P.J.V., AUGÉ DE MELLO, P. Development of a more rapid and simple procedure for two-dimensional oligonucleotide analysis of foot-and-mouth disease virus: RNA *minifingerprinting*. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 55: 39-42, 1989.
3. BERGMANN, I.E., TIRABOSCHI, B., MAZZUCA, G., FERNANDEZ, E., MICHAILOFF, C.A., SCODELLER, E.A., LA TORRE, J.L. Serological and biochemical analysis of foot-and-mouth disease virus (serotype C<sub>2</sub>) isolated in Argentina between 1981 and 1986. *Vaccine*, 6: 245-252, 1988.
4. BOLWELL, C., BROWN, A.L.L., BARNETT, P.V., CAMPBELL, R.O., CLARKE, B.E., PARRY, N.R. Host cell selection of antigenic variants of foot-and-mouth disease virus. *J. Gen. Virol.*, 70: 45-57, 1989.

5. COWAN, K.M., EROL, N., WHITEHEAD, A.P. Heterogeneity of type Asia 1 foot-and-mouth disease virus and BHK-21 cells and the relationship to vaccine preparation. *Bull. Off. int. Epiz.*, 81: 1271-1289, 1974.
6. DENOYA, C.D., SCODELLER, E.A., GIMÉNEZ, B.H., VASQUEZ, C., LA TORRE, J.L. Foot-and-mouth disease virus. Stability of its ribonucleic acid. *Virology*, 84: 230-235, 1978.
7. DIEZ, J., MATEU, M.G., DOMINGO, E. Selection of antigenic variants of foot-and-mouth disease virus in the absence of antibodies, as revealed by an "in situ" assay. *J. Gen. Virol.*, 70: 3281-3289, 1989.
8. DOMINGO, E., MATEU, M.G., MARTINEZ, M.A., DOPAZO, J., MOYA, SOBRINO, F. Genetic variability and antigenic diversity of foot-and-mouth disease virus. In: KURSTAK, E., MARUSYK, R.G., MURPHY, F.A., VAN REGENMORTEL, M.H.V. (Eds.). *Applied Virology Research*. New York, Plenum, 1990, pp. 233-266.
9. GONZALEZ, M., MATEU, M.G., MARTINEZ, M.A., CARRILLO, C., SOBRINO, F. Comparison of capsid protein VP1 of the viruses used for the production and challenge of foot-and-mouth disease vaccines in Spain. *Vaccine*, 10: 731-734, 1992.
10. HARRIS, T.J.R., BROWN, F. Biochemical analysis of a virulent and an avirulent strain of foot-and-mouth disease virus. *J. Gen. Virol.*, 34: 87-105, 1977.
11. HYSLOP, N. St. G., DAVIE, J., CARTER, S.P. Antigenic differences between strains of foot-and-mouth disease virus of type SAT 1. *J. Hyg.*, 61: 217-230, 1963.
12. LA TORRE, J.C. de, DAVILA, M., SOBRINO, F., ORTIN, J., DOMINGO, E. Establishment of cell lines persistently infected with foot-and-mouth disease virus. *Virology*, 45: 24-35, 1985.
13. LA TORRE, J.C. de, MARTINEZ-SALAS, E., DIEZ, J., VILLAVERDE, A., GEBAUER, F., ROCHA, E., DAVILA, M., DOMINGO, E. Co-evolution of cells and viruses in a persistent infection of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J. Virol.*, 62: 2050-2058, 1988.
14. LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685, 1970.
15. MELOEN, M. Localization of an antigenic deficiency induced by passage in BHK cells. *Arch. Virol.*, 51: 99-306, 1976.
16. NAKAJIMA, K., DESSELBERGER, U., PALESE, P. Recent human influenza A (H1N1) viruses are closely related genetically to strains isolated in 1950. *Nature*, 274: 334-339, 1978.
17. PARRY, N.R., RWEYEMAMU, M.M., PAY, T.W.F. Studies of plaque variants of foot-and-mouth disease vaccine virus. *Bull. Off. Int. Epiz.*, 89: 929-943, 1978.
18. PAY, T.W.F. Variation in foot-and-mouth disease: application to vaccination. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 2 (3): 701-723, 1983.
19. PEREIRA, H.G. Subtyping of foot-and-mouth disease virus. *Dev. Biol. Stand.*, 35: 167-174, 1977.
20. PEREIRA, H.G. Antigenic variation in relation to epidemiology and control of foot-and-mouth disease. *Br. Vet. J.*, 138: 58-62, 1978.
21. PEREIRA, H.G. Foot-and-mouth disease. In: GIBBS, E.P.J. (Ed.). *Virus disease of food Animals*. New York, Academic Press, 1981. v. 2. pp. 333-363.
22. ROWLANDS, D.J., CLARKE, B.E., CARROLL, A.R., BROWN, F., NICHOLSON, B.H., BITTLE, J.L., HOUGHTEN, R.A., LERVER, R.A. Chemical basis of antigenic variation in foot-and-mouth disease. *Nature*, 306: 694-697, 1983.
23. RWEYEMAMU, M.M. Antigenic variation in foot-and-mouth disease: studies based on the virus neutralization reaction. *J. Biol. Stand.*, 12: 323-337, 1984.
24. SAIZ, J.C., GONZALEZ, M.J., MORGAN, D.O., CARD, J.L., SOBRINO, F., MOORE, D.M. Antigenic comparison of different foot-and-mouth disease virus types using monoclonal antibodies defining multiple neutralizing epitopes on FMDV A5 subtypes. *Virus Res.*, 13: 45-60, 1989.
25. SOBRINO, F., DAVILA, M., ORTIN, J., DOMINGO, E. Multiple genetic variants arise in the course of replication of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *Virology*, 128: 310-318, 1983.
26. WEDDELL, G.N., YANSURA, D.G., DOWBENKO, D.J., HOATLIN, M.E., GRUBMAN, M.J., MOORE, D.M., KLEID, D.G. Sequence variation in the gene for the immunogenic capsid protein VP<sub>1</sub> of foot-and-mouth disease virus type A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 2618-2622, 1985.
27. XIE, Q.C., McCAHON, D., CROWTHER, J.R., BELSHAM, G.J., McCULLOUGH, K.C. Neutralization of foot-and-mouth disease virus can be mediated through any of at least three separate antigenic sites. *J. Gen. Virol.*, 68: 1637-1647, 1987.

## ASLAMIENTO DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EN ANIMALES DE LABORATORIO

### I. LIMITACIONES DE LA INFORMACION DISPONIBLE

O.J. DEGREGORIO<sup>1</sup>, V.M. VARELA-DIAZ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires

Avda. Chorroarín 280, Buenos Aires 1427, Argentina

<sup>2</sup>Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS)

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

**Resumen.** El análisis de la bibliografía disponible sobre el aislamiento del virus de la fiebre aftosa reveló que la inoculación de animales de laboratorio con fines diagnósticos no ha sido uniformada. Los estudios realizados sobre la efectividad de las distintas especies difieren metodológicamente entre sí, en lo que respecta a varios parámetros que incluyen la especie, edad, sexo y cepa del huésped, así como la dosis, vía de inoculación y volumen del inóculo. El empleo de virus adaptados a cultivos o a diferentes especies animales representa otra variable, si se considera que su infectividad no sería comparable a la de las cepas de campo. Por ende, se desconoce la susceptibilidad comparativa de las distintas especies de animales de laboratorio para aislar el virus de la fiebre aftosa y consecuentemente, su efectividad diagnóstica en muestras de bovinos infectados naturalmente.

Considerando que la fiebre aftosa es la enfermedad de mayor importancia económica para la ganadería de los países de América del Sur, la disponibilidad de procedimientos para su diagnóstico rápido y certero en animales enfermos, así como en portadores del agente, adquiere un interés primordial. De ahí que, para aislar el Aphthovirus que la causa, se hayan empleado distintas especies de animales de laboratorio, de características diversas.

En general, los trabajos efectuados en animales de laboratorio tratan sobre la etiopatogenia (3, 8, 10, 18, 19, 26, 28, 30, 32, 33, 35, 38, 42, 43) e inmunidad (14, 16) de la fiebre aftosa, así como sobre la evaluación de métodos diagnósticos

(1, 2, 4, 5, 7, 12, 15, 17, 20, 23, 24, 27, 31, 34, 36, 37, 39, 45). A tal efecto, se han utilizado ratones (5, 7, 12-14, 21, 24, 36, 39-41, 43-45), ratas (13, 14, 39), cobayos (1, 2, 5, 7, 9, 23, 39-42), conejos (9, 15, 20), hamsters (27, 29, 37) y meriones (17). En otros estudios similares también se han empleado otras especies, como bovinos (7, 22, 23, 36), porcinos, caninos, felinos y equinos (15) y otros sistemas como cultivos celulares (4, 7, 23, 31, 36) y embriones de pollo (34).

La revisión de la bibliografía sobre el aislamiento de los Aphthovirus realizada en este trabajo sugiere que el criterio para la elección de distintas especies de animales de laboratorio para inocularlas con fines diagnósticos no se ha basado en estudios comparativos normalizados. Al respecto, se analizan las características de los animales, inóculos, virus, y diseños experimentales empleados, con el propósito de fundamentar la necesidad de efectuar otros estudios sobre el particular.

Solicitar separatas al:

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS)



### Características de los animales

El número de animales utilizado en estos estudios, dato esencial para poder evaluar sus implicancias, se indica en la mayoría de las publicaciones (1,2,5,7,9,12,17,22,23,27,36,40,43-45), pero no se menciona en muchas otras (4,13,15,20,21,31,34,37,39,41,42).

Por otra parte, la edad de los animales muestra una gran variabilidad en las diversas publicaciones, a pesar de las reconocidas diferencias en susceptibilidad al Aphthovirus que se han asociado con esta característica (43). Así, se ha señalado el empleo de ratones neonatos (16) o lactantes sin especificar su edad (14), o de 1-2 días (23), de 4-7 días (43), de 4-8 días (21), de 4-10 días (13), de 5-7 días (44), de 5-8 días (5), de 6-8 días (7,36) o de 7-10 días (40); ratones de 1 semana (41), de 3 semanas (40), de más de 5 semanas (39) o de 60-80 días (12); adultos gestantes (14), hembras de 90 días de edad (5), o de 3 a 9 meses (45). En lo que respecta a otras especies, su edad ha sido especificada para las ratas como de 10-20 horas (13) o lactantes (14,39); para los conejos, neonatos (15), o de 45 días de edad (20); y para los hamsters de 7 a 21 días (37) o de 7 a 60 días (35).

En el caso de los meriones, se han utilizado lactantes, de 1 a 4 meses y adultos (17) y, de los bovinos, novillos de 2 años (22). En los diversos trabajos, los cobayos inoculados eran de 3 semanas (7) de 3 a 10 semanas (41) ó 2 a 4 meses (42). No obstante, en la mayoría se opta por hacer referencia al peso de los mismos, que era 450-500 g (1), 450-550 g (24),  $464,15 \pm 5,2$  g (2) ó 500-800 g (42).

En lo referente al sexo de los animales de experimentación, se han utilizado ratones hembra (5,12,14,39,44) o bien, novillos (7) y cobayos machos (18), mientras que en otras publicaciones no se hace mención a este dato (1,2,4,13,15,20-24,29-36,40,42,43,45).

Se ha demostrado la existencia de variaciones en susceptibilidad a la infección con el virus de la fiebre aftosa entre diferentes cepas de animales de laboratorio (44). No obstante, se han llevado a cabo aislamientos empleando más de 16 estirpes distintas de ratones (5,7,12,23,43-45). Por otra parte, el nombre de la línea no se mencionó en

un importante número de artículos (1,2,13-15,20-22,31,36,39,40), mientras que en otros, se utilizó la línea de cobayos denominada Duncan-Hartley (7,24).

### Características del inóculo

Además de estas variaciones en las características de los distintos animales de laboratorio, tampoco se registra uniformidad en cuanto al inóculo empleado y las condiciones técnicas de su aplicación.

Así, se puede observar que para aislar el Aphthovirus, se han utilizado distintas vías de inoculación. Por ejemplo, los ratones se han inyectado por la vía intraperitoneal (5,7,12-14,21,23,36,37,39,42-45), subcutánea (13,21), intracerebral (21,40) e intramuscular (21,41,45); las ratas, por la vía intraperitoneal (13,14) mientras que para los cobayos, se ha optado por las vías intradermoplantar (1,2,39-42), intralingual (7,24), subcutánea (15), intraperitoneal, intramuscular o digestiva (15,42). Por otra parte, los conejos se inocularon por la vía intraperitoneal (15) o subcutánea (20); los hamsters por escarificación (27) o por vías subcutánea, intradérmica, intraperitoneal e intracraneal (35). Los meriones se inocularon por la vía intraperitoneal o intradermoplantar (17) y los bovinos por vía intradermolingual (7,22,23,36). En algunos trabajos no se cita la vía de inoculación (34,37).

La mayoría de los trabajos no indican la dosis de virus inoculada (2,4,5,7,9,12-15,17,20-24,27,31,36,37,40-45). En otros, su rango estaba comprendido dentro de un gran espectro:  $10^4$ - $10^6$  DI<sub>50</sub> en ratones (39); o simplemente, una dilución  $10^{-4}$  (1).

Aunque en la mayoría de las publicaciones no se cita el volumen inoculado por las distintas vías (1,2,14,20,34,37,39,41,42), en las restantes se registra una gran variabilidad en este parámetro. Así, en ratones inoculados por la vía intraperitoneal se utilizaron 0,001-0,27 ml (21), 0,03 ml (21,23,40,43), 0,04-0,3 ml (13), 0,05 ml (7), 0,1 ml (5,44,45), 0,5 ml (12). Sin embargo, por la vía subcutánea se administró 0,01-0,27 ml (21) ó 0,04-0,3 ml (13), mientras que por vía intramuscular, el volumen fue de 0,001-0,05 ml (21). En cobayos, el inóculo varió de 0,5-100 ml por vía intraperitoneal

(15,36) a 0,1 ml por vía intradermolingual (36) hasta 0,3 ml por vía intradermoplantar (7). En hamsters se inoculó 0,20 ml (32) ó 0,25 ml (29) por vía intramuscular y en conejos, de 0,25 a 1,0 ml (9) por vía intraperitoneal. En meriones 0,2 ml por vía intraperitoneal o intradermoplantar (17) y en bovinos entre 0,1 y 2 ml por vía intradermolingual (7,22,23).

### Características del virus

Una de las principales limitaciones para interpretar la literatura en términos de la susceptibilidad comparativa de las distintas especies de animales de laboratorio, y por consiguiente de su efectividad diagnóstica, está asociada con el origen de la cepa de Apthovirus utilizada.

En ciertos estudios, se utilizaron cepas modificadas (1,2,5,7,9,12,13,15,17,20,22,23,24,27,31,33,34,36,37,39,40-45) mediante pasajes en ratones (9,15,31,32,39-41,44,45), cobayos (1,2,13,17,24,27,33,34,41,42), hamsters (37), bovinos (1,2,7,12,13,22,33,36,39,41,44,45), conejos (20), lechones o en embriones de pollo (14). En otros, las cepas provenían de células del epitelio lingual bovino (7,23,36,45), de cultivos celulares de diversos orígenes (31,43), o células BHK21 (12), células renales de bovino (5,44), células renales de porcino (44,45). En todos estos trabajos, el número de pasajes del virus osciló en un rango entre 2 y 425.

Si se considera que la infectividad y la virulencia de los Apthovirus para diferentes especies animales se modifica mediante pasajes repetidos *in vitro* e *in vivo* (6,11,25), resulta difícil de determinar si los hallazgos obtenidos a partir de virus que no provienen de infecciones naturales, son aplicables a situaciones de campo. A tal efecto, cabe señalar que solo en algunos trabajos se emplearon cepas de campo (4,14,15,21,35,45), aunque en la mayoría de estos, el virus de campo había sido mantenido a través de sucesivos pasajes en ratones (15,21,45) o alternativamente, en ratas y ratones (14).

En solo dos publicaciones (4,35) los resultados se basan en el uso de cepas de campo obtenidas directamente a partir de muestras de bovinos infectados, aunque en uno de ellos (35), los hallazgos no se diferenciaron de los obtenidos con cepas adaptadas. Esta escasez de información no

estaría en consonancia con la importancia del aislamiento del virus para los estudios epidemiológicos y el control de la fiebre aftosa.

Por otra parte, en los estudios realizados se han empleado diferentes virus, pertenecientes tanto al tipo O (1,2,7,9,12-15,22,23,27,34,36,37,40,43,44), tipo A (1,2,5,7,9,13-15,22-24,,27,34,36,40,41,44), tipo C (1,2,7,9,13-15,17,22,23,24,27,31,36,39,40,42-44), SAT1 y SAT2 (7,23,36,40,44), y SAT3 (7,22,23,36,44), como al tipo Asia 1 (7,23,36,44). En algunas publicaciones, no se citó el tipo de virus empleado (4,20,21,45).

Cabe señalar que la titulación de las distintas cepas de virus se ha llevado a cabo en ratones (7,9,12,21,27,43,45), cobayos (1,2,7,14,42), cultivos de tejidos (7), y en epitelio lingual bovino (7,9,22,23). En otros estudios no se proporcionó este dato (4,5,13,17,20,24,31,34,36,37,39-41,44). Además, el efecto del virus sobre los distintos animales se comprobó a través de diferentes técnicas. Estas incluyeron la observación de síntomas y lesiones clínicas (5,9,13,17,20,27,37,40-42); la titulación viral de órganos y/o tejidos (9,13,20,41); la cuantificación de anticuerpos (4,12,14); la determinación en ratones de la  $DI_{50}$  (1,2,7,22,36,39,40,43,44) o de la  $DL_{50}$  con la técnica de Reed y Muench (12,15,21,24,36,37).

### CONCLUSIONES

Esta revisión revela limitaciones importantes sobre la utilidad de animales de laboratorio empleados actualmente para aislar el virus de la fiebre aftosa con fines diagnósticos. Resulta evidente la necesidad de diseñar y conducir estudios para determinar cuál especie es la más apropiada para trabajos futuros en este campo, a fin de incrementar la eficiencia y eficacia del diagnóstico. Los estudios deberán diseñarse para evaluar la respuesta de diferentes huéspedes a la infección, bajo idénticas condiciones fisiológicas y empleando inóculos estandarizados respecto de la dosis viral, volúmenes y vías de administración. Finalmente, se considera de particular importancia que el Apthovirus empleado no haya sido adaptado a ningún sistema de laboratorio.

En general, y sobre la base de lo expuesto en este trabajo, se concluye que se desconoce la eficiencia

comparativa de las distintas especies de animales de laboratorio para el aislamiento del virus de la fiebre aftosa a partir de muestras de bovinos infectados naturalmente.

### RECONOCIMIENTO

El autor principal presentó este trabajo en cumplimiento parcial de los requisitos para el título de Magister en Salud Animal de la Universidad de Buenos Aires.

### REFERENCIAS

1. ARAMBURU, H.G. A comparison of different methods of inoculating guinea-pigs with the virus of foot-and-mouth disease. *J. Comp. Path.*, 59 (1): 43-47, 1949.
2. ARAMBURU, H.G. Inoculación de prueba en cobayos con virus aftoso: comparación de diferentes métodos. Inst.Nac.de Fiebre Aftosa. Minist. de Agric. de la Nación, 1949. (Pub. n° 9).
3. BROWN, C.C., OLANDER, H.J., MEYER, R.F. Pathogenesis of foot-and-mouth disease in guinea pigs using in situ hybridization. *Proc. Annual Mtg. US. Animal Hlth. Assoc.*, 93: 321-323, 1989.
4. BUCKLEY, L.S., OSBORNE, R.W., PEREIRA, H.G. Laboratory diagnosis of foot- and-mouth disease and swine vesicular disease. *Bull. Off. int. Epiz.*, 88 (1-2): 128-129, 1975.
5. CAMPBELL, C.H. The susceptibility of mother mice and pregnant mice to the virus of foot-and-mouth disease. *J. Immunol.*, 84: 469-474, 1960.
6. CARRILLO, C.E., RIEDER ROJAS, E., CAVALLARO, L., SCHIAPPACASSI, M., CAMPOS, R. Modification of foot-and-mouth disease virus after serial passages in the presence of antiviral polyclonal sera. *Virology*, 171: 599-601, 1989.
7. COTTRAL, G.E., PATTY, R.E., GALLUNAS, P., SCOTT, F.W. Sensitivity of cell cultures, cattle, mice and guinea-pigs for detection of nineteen foot-and-mouth disease viruses. *Bull. Off. int. Epiz.*, 63 (9-10): 1607-1625, 1965.
8. CUNHA, R.G., EICHHORN, E.A. Influence of cortisone on susceptibility of adult mice to foot-and-mouth disease virus. *Am. J. Vet. Res.*: 149-151, 1954.
9. CUNHA, R.G., EICHHORN, E.A. Studies on rabbit-adapted foot-and-mouth disease virus. I. Propagation and pathogenicity. *Am. J. Vet. Res.*: 133-138, 1959.
10. DACORSO FILHO, P., CUNHA, R.G. Lesões observadas em coelho recém-nascidos inoculados com amostras de tres tipos de virus de febre aftosa. *Bol. Soc. Bras. Med. Vet.*, 19: 91-102, 1951.
11. DIEZ, J., MATEU, M.G., DOMINGO, E. Selection of antigenic variants of foot-and-mouth disease virus in the absence of antibodies, as revealed by an in situ assay. *J. Gen. Virol.*, 70: 3281-3289, 1989.
12. FERNANDEZ, F.M., BORCA, M.V., SADIR, A.M., FONDEVILA, N., MAYO, J., SCHUDEL, A.A. Foot-and-mouth disease virus (FMDV) experimental infection: susceptibility and immune response of adult mice. *Vet. Microbiol.*, 12: 15-24, 1986.
13. GARCIA MATA, E., PIZZI, L., ARAMBURU, H. El cultivo del virus aftoso en el ratón y en la rata blanca: su aplicación en los problemas de virología. *Gaceta Veterinaria*, 13 (74): 1-8, 1951.
14. GARCIA MATA, E., PIZZI, L., ARAMBURU, H. Algunos aspectos de investigaciones con virus aftoso murinizado. *Gaceta Veterinaria*, 14 (79): 223, 1952.
15. GARCIA MATA, E., FEDERER, K.E., PIZZI, L., ARAMBURU, H.G. Acción patógena del virus aftoso en neonatos de diferentes especies. *Gaceta Veterinaria*, 17 (94): 57-64, 1955.
16. GARCIA MATA, E., FEDERER, K.E., PIZZI, L., MARCOVECCHIO, F.E., ARAGONA, J. Vacuna antiaftosa con virus adaptado a neonatos. En: *Congreso Argentino de Fiebre Aftosa*, Buenos Aires, Argentina, 14 - 15 de mayo de 1957. p. 233 237.
17. GIROUD, P., CIACCIO, G. Adaptation au mérion du virus aphteux. *C.R. Soc. Biol., Paris.*, 148: 31-32, 1954.
18. GORHE, D.S. Inhibition of multiplication of foot-and-mouth disease virus in adult mice pretreated with Freund's complete adjuvant. *Nature*, 216: 1242-1244, 1967.
19. GRAVES, J.H., McKERCHER, P.D., CALLIS, J.J. Foot-and-mouth disease vaccine. Influence of the vaccine virus subtype on neutralizing antibody and resistance to disease. *Am. J. Vet. Res.*, 33 (4): 765-768, 1972.
20. GRIBANOV, V. Résultats de l'épreuve du vaccin antiaphteux VIEV préparé avec un virus adapté au lapin. *Bull. Off. int. Epiz.*, 43 (1): 632 635, 1955.
21. HEATLEY, W., SKINNER, H.H., SUBAK-SHARPE, H. Influence of route of inoculation and strain of mouse on infectivity titrations of the virus of foot-and-mouth disease. *Nature*, 186 (4728): 99-911, 1960.

22. HENDERSON, W.M. A comparison of different routes of inoculation of cattle for detection of the virus of foot-and-mouth disease. *J. Hyg.*, 50 (2): 182-194, 1952.
23. HOUSE, C., HOUSE, J.A. Evaluation of techniques to demonstrate foot-and-mouth disease virus in bovine tongue epithelium: comparison of the sensitivity of cattle, mice, primary cell cultures, cryopreserved cell cultures and established cell lines. *Vet. Microbiol.*, 20: 99-109, 1989.
24. HYDE, J.L., GRAVES, J.H. The comparative titration of foot-and-mouth disease virus inoculated into the tongue and foot pads of guinea pigs. *Am. J. Vet. Res.*, 24: 99-100, 1963.
25. HYSLOP, N. St. G. Isolation of variants strains from foot-and-mouth disease virus in cell culture containing antiviral sera. *J. Hyg., Camb.*, 41: 135-142, 1965.
26. KNUDSEN, R.C., GROOCKOCK, C.M., ANDERSEN, A.A. Difference in protective immunity of the tongue and feet of guinea pigs vaccinated with foot-and-mouth disease virus type A12 following intradermolingual and footpad challenge. *Vet. Microbiol.*, 7: 97-107, 1982.
27. KORN, G. Die Erkrankung des goldhamsters, *Mesocricetus auratus*, an Maul- und Klauenseuche. *Arch. Exp. Vet. Med.*, 6 (Suppl.): 36-37, 1952.
28. KORN, G. Die pathogenese und histogenese der Maul- und Klauenseuche des goldhamsters, *Mesocricetus auratus*. *Arch. Exp. Vet. Med.*, 7: 192-225, 1953.
29. LOMBARDO, H.J., MAYO, J., ABADIE, G., RIVENSON, S., SMOLKO, E.E. Adaptación del virus aftoso al hamster adulto. *Rev. Inv. Agrop. Ser. 4*, 6 (8): 87-94, 1969.
30. LORD, R.D. Experimental infection of vampire bats with foot-and-mouth disease virus. *J. Wild. Dis.*, 22 (3): 413-414, 1986.
31. MACKOWIAK, C., LANG, R. Emploi des cultures de tissu dans le titrage du virus aphteux et la recherche des anticorps. *Bull. Off. int. Epiz.*, 49: 99-105, 1958.
32. MAYO, J., LOMBARDO, J.H., SMOLKO, E.E., SEGURA, M., RIVENSON, S. Multiplicación del virus aftoso en roedores adultos previamente irradiados. *Rev. Inv. Agrop. Ser. 4*, 3 (6): 57-69, 1966.
33. NAGEL, H.G. El comportamiento del virus aftoso en animales lactantes de diferentes especies. *Gaceta Veterinaria*, 14 (76): 52-59, 1952.
34. NAGEL, H.C., PETERMANN, H.G. El comportamiento del virus aftoso en el embrión de pollo. *Gaceta Veterinaria*, 14 (76): 73-78, 1952.
35. PALMA, E.E. Acción del virus aftoso frente al *Cricetus cricetus* (Hamster). En: *Congreso Argentino de Fiebre Aftosa*, Buenos Aires, Argentina, 14-16 de mayo de 1957. p.131-142.
36. PATTY, R.E., COTTRAL, G.E., GAILJUNAS, P. Comparative assay of foot-and-mouth disease virus in cattle, mice and cell cultures. *Bull. Off. int. Epiz.*, 63 (9-10): 1595-1606, 1965.
37. SCHMIDT FUNES, E. Receptivité du hamster au virus de la fièvre aphteuse. *Bull. Off. int. Epiz.*, 43: 756-760, 1955.
38. SCHUDEL, A.A., SADIR, A.M., ETCHEVERRIAGARAY, M.E., SAMUS, S., COLLA, O., RIVENSON, S. Susceptibility of South American non-primates to foot-and-mouth diseases virus. *Bull. Off. int. Epiz.* 93 (11-12): 1345-1350, 1981.
39. SKINNER, H.H., HENDERSON, W.M., BROOKSBY, J.B. Use of unweaned white mice in foot-and-mouth disease research. *Nature*, 169 (4306): 794-796, 1952.
40. SKINNER, H.H. Propagation of strains of foot-and-mouth disease virus in unweaned white mice. *Proc. Roy. Soc. Med.*, 44: 1041-1044, 1958.
41. SKINNER, H.H., SMITH, I.M., HOLLUM, S.E., KNIGHT, E.H. Attenuated strains of the virus of foot-and-mouth disease. Studies in small animals with strains of common origin modified by different methods. *Arch. Ges. Virusforschung*, 12: 472-486, 1962.
42. SKINNER, H.H., KNIGHT, E.H. Environmental factors influencing the response of guinea-pigs to modified strains of foot-and-mouth disease virus. *Bull. Off. int. Epiz.*, 61 (9-10): 1-21, 1964.
43. SUBAK-SHARPE, H. The quantitative study of foot-and-mouth disease virus in unweaned mice. 1. Studies of various factors affecting quantitative analysis. *Arch. Ges. Virusforschung*, 11: 1-38, 1961.
44. SUBAK-SHARPE, H. The quantitative study of foot-and-mouth disease virus in unweaned mice. 2. Studies with additional mouse strains and comparison of some methods of titration. *Arch. Ges. Virusforschung*, 11: 39-63, 1961.
45. SUBAK-SHARPE, H. The effect of passage history, route of inoculation, virus strain and host strain on the susceptibility of adult mice to the virus of foot-and-mouth disease. *Arch. Ges. Virusforschung*, 11 (3): 373-399, 1961.

## ISOLATION OF FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS IN LABORATORY ANIMALS

### I. LIMITATIONS OF AVAILABLE INFORMATION

O.J. DEGREGORIO<sup>1</sup>, V.M. VARELA-DIAZ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires  
Avda. Chorroarín 280, Buenos Aires 1427, Argentina

<sup>2</sup>Pan-American Foot-and-Mouth Disease Center (PAHO/WHO)  
P.O. Box 589, 20001-970 Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

**Summary.** Analysis of the available literature on the isolation of foot-and-mouth disease virus revealed that the inoculation of laboratory animals for diagnostic purposes has not been uniform. Studies carried out on the effectiveness of a variety of species differ from each other methodologically in several parameters which include the species, age, sex and strain of host as well as the dose, route of administration, and volume of the inoculum. The use of viruses adapted to culture or to different laboratory animal species represents another variable if it is considered that their infectivity may not be comparable to that of field strains. On this basis, the comparative susceptibility of the different species of laboratory animals to isolate Aphthovirus, and consequently, their diagnostic effectiveness in samples from bovines with natural infections, remains to be determined.

Considering the great economic importance of foot-and-mouth disease to the livestock industry of South American countries, the availability of procedures for its rapid and accurate diagnosis, both in clinical cases and in carriers, is of prime interest. For this reason, a variety of laboratory animal species of diverse characteristics has been employed to isolate the Aphthovirus responsible for its etiology.

In general, work in laboratory animals has dealt with the pathogenicity (3, 8, 10, 18, 19, 26, 28, 30, 32, 33, 35, 38, 42, 43) and immunity (14, 16) of foot-and-mouth disease, as well as on the evaluation of diagnostic procedures (1, 2, 4, 5, 7, 12, 15, 17, 20, 23, 24, 27, 31, 34, 36, 37, 39, 45). Animals used for these studies included mice (5, 7, 12-14, 21, 23, 36, 39-41, 43-45), rats (13, 14, 39), guinea pigs (1, 2, 5,

7, 9, 24, 39-42), rabbits (9, 15, 20), hamsters (27, 29, 37) and gerbils (17). Other species such as bovines (7, 22, 23, 36), swine, dogs, cats and equines (15) as well as other systems, such as cell cultures (4, 7, 23, 31, 36) and chick embryos (34) have also been used.

The review of the literature on the isolation of Aphthovirus presented in this report suggested that the criteria for selecting different species of laboratory animals to inoculate them for diagnostic purposes were not based on standardized comparative studies. Accordingly, an analysis was made of the characteristics of the animals, viruses, inocula and experimental designs used, with the purpose of assessing the need to perform other studies on the subject.

#### Characteristics of animals

Firstly, it should be pointed out that the number of animals used, an essential fact to evaluate the implications of these studies, is reported in

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

most publications (1,2,5,7,9,12,17,22, 23,27, 36,40,43-45), but not in many others (4,13, 15,20,21,31,34,37,39,41,42).

On the other hand, the age of animals varies widely throughout these papers, although it is recognized that differences in susceptibility have been associated with this characteristic (43). For example, reference was made to the use of newborn (16) or suckling mice of an unspecified age (14), or mice aged 1-2 days (23), 4-7 days (43), 4-8 days (21), 4-10 days (13), 5-7 days (44), 5-8 days (5), 6-8 days (7,36), or 7-10 days (40); mice aged one (41), three (40), or over five weeks (39) or 60-80 days (12); pregnant adults (14), females of 90 days (5), or 3 to 9 months old (45).

For other species, ages of rats were specified as 10-20 hours (13) or as suckling rats (14,39); for rabbits, merely newborns (15), or 45-day olds (20); and for hamsters, ages were given as 7 to 21 days (37) or 7 to 60 days (35). Gerbils used were 1-4 months old, suckling and adult animals (17); and calves were two years old (22). The ages of inoculated guinea pigs were 3 weeks (7), 3 to 10 weeks (41) or two to four months (42). Nevertheless, in most papers the option was made to refer to their weight, which was 450-500 g (1), 450-550 g (24), 464,15 ± 5,2 g (2) or 500-800 g (42).

The sex of experimental animals included female mice (5, 12, 14, 39, 44) and male calves (7) or guinea pigs (18). This characteristic was not mentioned in other publications (1,2,4,13,15,20-24,29-36,40,42,43,45).

The existence of variations in susceptibility to Aphthovirus infection among the different strains of laboratory animals has been demonstrated (44). Nevertheless, isolations have been made using more than 16 different *inbred and outbred* mice (5,7,12,23,43-45). On the other hand, this information was not reported for other species in a significant number of articles (1,2,13-15,20-22, 31,36,39,40), while in others (7, 24), Duncan-Hartley guinea pigs were used.

### Characteristics of the inoculum

As with the above variations in the characteristics of the different laboratory animals, neither the inocula nor the technical conditions used for their administration have been uniformed.

Thus, different routes of inoculation have been used to isolate Aphthovirus. For instance, mice have been infected by intraperitoneal (5,7,12,14, 21,23,36,37,39,42-45), subcutaneous (13,21), intracerebral (21,40) and intramuscular (21,41,45) routes, and rats were inoculated intraperitoneally (13,14). In guinea pigs, the routes included intradermoplar (1,2,39-42), intralingual (7,24), subcutaneous (15) and intramuscular, intraperitoneal or digestive (15, 42). On the other hand, inoculations were intraperitoneal (15) or subcutaneous (20) for rabbits and by scarification (27) or by the intradermal, intraperitoneal and intracranial (35) routes in hamsters. Gerbils were given intradermoplar or intraperitoneal (17) inoculations, while in bovines, they were intradermolingual (7,22,23,36). In some papers (34,37), reference was not made to the route of inoculation.

The dose of virus which was inoculated is not indicated in most publications (2,4,5,7,9,12-15, 17,20-24,27,31,36,37,40-45). In others, the range constituted a wide spectrum:  $10^4$  to  $10^6$  ID<sub>50</sub> in mice (39); or only a  $10^{-4}$  dilution (1).

In most reports, no mention was made of the volume inoculated (1,2,14,20,34,37,39,41,42) and in the remainder, there was a great variability in this parameter. Thus, in mice given intraperitoneal infections, inocula consisted of 0.001-0.27 ml (21), 0.03 ml (21, 23, 40, 43), 0.04-0.03 ml (13), 0.05 ml (7), 0.1 ml (5, 44, 45), or 0.5 ml (12), while volumes of 0.01-0.27 ml (21) or 0.04-0.03 ml (13) were administered subcutaneously, and quantities of 0.001-0.05 ml were applied intramuscularly. Inoculations in guinea pigs varied from 0.5-100 ml intraperitoneally (15, 36) to 0.1 ml by the intradermolingual (36) routes to as much as 0.3 ml by the intradermoplar (7) route. In hamsters, inocula of 0.20 ml (32) or 0.25 ml (29) were administered intramuscularly, and in rabbits, from 0.25 to 1.0 ml (9) were given intraperitoneally. In

gerbils, 0.2 ml were inoculated by the intraperitoneal or intradermoplar routes (17) while in bovines, the injections were intralingual and varied between 0.1 and 2 ml (7,22,23).

### Characteristics of the virus

One of the principal limitations to interpreting the literature in terms of the comparative susceptibility of different laboratory animal species, and consequently, of the diagnostic effectiveness of this method, is associated with the origin of the strain of Aphthovirus used.

In certain studies, modified strains were used (1,2,5,7,9,12,13,15,17,20,22,23,24,27,31,33,34,36,37,39,40-45). These had been obtained by passages in mice (9,15,31,32,39-41,44,45), guinea pigs (1,2,13,17,24,27,33,34,41,42), hamsters (37), bovines (1,2,7,12,13,22,33,36,39,41,44,45), rabbits (20), piglets or chick embryos (14). In others, the strains were derived from cell cultures of bovine lingual epithelium (7,23,36,45), or of diverse origin (31,43), BHK21 (12), bovine kidney (5,44), or pig kidney cells (44, 45). In these studies, the number of passages of the virus ranged between 2 and 425.

If it is considered that the infectivity and virulence of Aphthovirus for different animal species is modified by repeated passage *in vitro* or *in vivo* (6,11,25), findings obtained with viruses which did not originate from natural infections are difficult to assess in terms of their applicability to field situations. Along these lines, it should be pointed out that only in some studies (4,14,15,21,35,45) were field strains employed. In most of them, the field viruses had been maintained through successive passages in mice (15,21,45) or alternatively, in rats and mice (14).

Only in two publications (4, 35) were results based on the use of field strains obtained directly from samples of infected bovines, although in one (35), findings were not differentiated from those obtained with adapted strains. This paucity of information does not seem consonant with the importance of foot-and-mouth disease virus isolations for epidemiologic and control purposes.

On the other hand, different viruses were used in published studies. These belonged to type O

(1,2,7,9,12-15,22,23,27,34,36,37,40,43, 4), type A (1,2,5,7,9,13-15,22,23,27,34,36,40,41,44), type C (1,2,7,9,13-15,17,22,24,27,31,36,39,40,42-44), SAT1 and SAT2 (7,23,36,40,44), and SAT3 (7,22,23,36,44), as well as type Asia 1 (7,23,36,44). In some publications (4,20,21,45), the type of virus employed was not stated.

Also, titrations of the various viral strains were carried out in mice (7,9,12,21,27,43,45), guinea pigs (1,2,7,14,42), tissue cultures (7), and bovine lingual epithelium (7,9,22,23). Nevertheless, these data were not provided in other studies (4,5,13,17,20,24,31,34,36,37,39-41, 44). Furthermore, virus effects on the various animals were assessed by different techniques. These included the observation of clinical signs and lesions (5,9,13,17,20,27,37,40-42); viral titrations of organs and/or tissues (9,13,20,41); quantification of antibodies (4,12,14); determination of ID<sub>50</sub> in mice (1,2,7,22,36,39,40,43,44) or of LD<sub>50</sub> by the method of Reed and Muench (12,15,21,24,36,37).

### CONCLUSIONS

This review points out important limitations on the usefulness of laboratory animals currently employed to isolate foot and mouth disease virus for diagnostic purposes. It is evident that studies must be devised and conducted to determine which species is most appropriate for future work in this field to enhance the efficiency and effectiveness of diagnosis. The studies must be designed to evaluate the responsiveness of different hosts to infection under identical physiological conditions and employ inocula that are standardized with respect to the viral dose, volumes and routes of administration. Finally, it appears to be particularly important that the Aphthovirus employed have not been adapted to any laboratory system.

### ACKNOWLEDGEMENT

This study was submitted by the senior author in partial fulfillment of the requirements for the degree of Magister en Salud Animal de la Universidad de Buenos Aires.

## REFERENCES

1. ARAMBURU, H.G. A comparison of different methods of inoculating guinea-pigs with the virus of foot-and-mouth disease. *J. Comp. Path.*, 59 (1): 43-47, 1949.
2. ARAMBURU, H.G. Inoculación de prueba en cobayos con virus aftoso: comparación de diferentes métodos. Inst.Nac.de Fiebre Aftosa. Minist. de Agric. de la Nación, 1949. (Pub. n° 9).
3. BROWN, C.C., OLANDER, H.J., MEYER, R.F. Pathogenesis of foot-and-mouth disease in guinea pigs using in situ hybridization. *Proc. Annual Mtg. US. Animal Hlth. Assoc.*, 93: 321-323, 1989.
4. BUCKLEY, L.S., OSBORNE, R.W., PEREIRA, H.G. Laboratory diagnosis of foot- and-mouth disease and swine vesicular disease. *Bull. Off. int. Epiz.*, 88 (1-2): 128-129, 1975.
5. CAMPBELL, C.H. The susceptibility of mother mice and pregnant mice to the virus of foot-and-mouth disease. *J. Immunol.*, 84: 469-474, 1960.
6. CARRILLO, C.E., RIEDER ROJAS, E., CAVALLARO, L., SCHIAPPACASSI, M., CAMPOS, R. Modification of foot-and-mouth disease virus after serial passages in the presence of antiviral polyclonal sera. *Virology*, 171: 599-601, 1989.
7. COTTRAL, G.E., PATTY, R.E., GAILIUNAS, P., SCOTT, F.W. Sensitivity of cell cultures, cattle, mice and guinea-pigs for detection of nineteen foot-and-mouth disease viruses. *Bull. Off. int. Epiz.*, 63 (9-10): 1607-1625, 1965.
8. CUNHA, R.G., EICHHORN, E.A. Influence of cortisone on susceptibility of adult mice to foot-and-mouth disease virus. *Am. J. Vet. Res.*: 149-151, 1954.
9. CUNHA, R.G., EICHHORN, E.A. Studies on rabbit-adapted foot-and-mouth disease virus. I. Propagation and pathogenicity. *Am. J. Vet. Res.*: 133-138, 1959.
10. DACORSO FILHO, P., CUNHA, R.G. Lesões observadas em coelho recém-nascidos inoculados com amostras de tres tipos de virus de febre aftosa. *Bol. Soc. Bras. Med. Vet.*, 19: 91-102, 1951.
11. DIEZ, J., MATEU, M.G., DOMINGO, E. Selection of antigenic variants of foot-and-mouth disease virus in the absence of antibodies, as revealed by an in situ assay. *J. Gen. Virol.*, 70: 3281-3289, 1989.
12. FERNANDEZ, F.M., BORCA, M.V., SADIR, A.M., FONDEVILA, N., MAYO, J., SCHUDEL, A.A. Foot-and-mouth disease virus (FMDV) experimental infection: susceptibility and immune response of adult mice. *Vet. Microbiol.*, 12: 15-24, 1986.
13. GARCIA MATA, E., PIZZI, L., ARAMBURU, H. El cultivo del virus aftoso en el ratón y en la rata blanca: su aplicación en los problemas de virología. *Gaceta Veterinaria*, 13 (74): 1-8, 1951.
14. GARCIA MATA, E., PIZZI, L., ARAMBURU, H. Algunos aspectos de investigaciones con virus aftoso murinizado. *Gaceta Veterinaria*, 14 (79): 223, 1952.
15. GARCIA MATA, E., FEDERER, K.E., PIZZI, L., ARAMBURU, H.G. Acción patógena del virus aftoso en neonatos de diferentes especies. *Gaceta Veterinaria*, 17 (94): 57-64, 1955.
16. GARCIA MATA, E., FEDERER, K.E., PIZZI, L., MARCOVECCHIO, F.E., ARAGONA, J. Vacuna antiaftosa con virus adaptado a neonatos. En: *Congreso Argentino de Fiebre Aftosa*, Buenos Aires, Argentina, 14 - 15 de mayo de 1957. p. 233 237.
17. GIROUD, P., CIACCIO, G. Adaptation au mérion du virus aphteux. *C.R. Soc. Biol., Paris.*, 148: 31-32, 1954.
18. GORHE, D.S. Inhibition of multiplication of foot-and-mouth disease virus in adult mice pretreated with Freund's complete adjuvant. *Nature*, 216: 1242-1244, 1967.
19. GRAVES, J.H., McKERCHER, P.D., CALLIS, J.J. Foot-and-mouth disease vaccine. Influence of the vaccine virus subtype on neutralizing antibody and resistance to disease. *Am. J. Vet. Res.*, 33 (4): 765-768, 1972.
20. GRIBANOV, V. Résultats de l'épreuve du vaccin antiaphteux VIEV préparé avec un virus adapté au lapin. *Bull. Off. int. Epiz.*, 43 (1): 632 635, 1955.
21. HEATLEY, W., SKINNER, H.H., SUBAK-SHARPE, H. Influence of route of inoculation and strain of mouse on infectivity titrations of the virus of foot-and-mouth disease. *Nature*, 186 (4728): 99-911, 1960.
22. HENDERSON, W.M. A comparison of different routes of inoculation of cattle for detection of the virus of foot-and-mouth disease. *J. Hyg.*, 50 (2): 182-194, 1952.
23. HOUSE, C., HOUSE, J.A. Evaluation of techniques to demonstrate foot-and-mouth disease virus in bovine tongue epithelium: comparison of the sensitivity of cattle, mice, primary cell cultures, cryopreserved cell cultures and established cell lines. *Vet. Microbiol.*, 20: 99-109, 1989.
24. HYDE, J.L., GRAVES, J.H. The comparative titration of foot-and-mouth disease virus inoculated into the tongue and foot pads of guinea pigs. *Am. J. Vet. Res.*, 24: 99-100, 1963.



25. HYSLOP, N. St. G. Isolation of variants strains from foot-and-mouth disease virus in cell culture containing antiviral sera. *J. Hyg., Camb.*, 41: 135-142, 1965.
26. KNUDSEN, R.C., GROOCOCK, C.M., ANDERSEN, A.A. Difference in protective immunity of the tongue and feet of guinea pigs vaccinated with foot-and-mouth disease virus type A12 following intradermolingual and footpad challenge. *Vet. Microbiol.*, 7: 97-107, 1982.
27. KORN, G. Die Erkrankung des goldhamsters, *Mesocricetus auratus*, an Maul- und Klauenseuche. *Arch. Exp. Vet. Med.*, 6 (Suppl.): 36-37, 1952.
28. KORN, G. Die Pathogenese und Histogenese der Maul- und Klauenseuche des Goldhamsters, *Mesocricetus auratus*. *Arch. Exp. Vet. Med.*, 7: 192-225, 1953.
29. LOMBARDO, H.J., MAYO, J., ABADIE, G., RIVENSON, S., SMOLKO, E.E. Adaptación del virus aftoso al hamster adulto. *Rev. Inv. Agrop. Ser. 4*, 6 (8): 87-94, 1969.
30. LORD, R.D. Experimental infection of vampire bats with foot-and-mouth disease virus. *J. Wild. Dis.*, 22 (3): 413-414, 1986.
31. MACKOWIAK, C., LANG, R. Emploi des cultures de tissu dans le titrage du virus aphteux et la recherche des anticorps. *Bull. Off. int. Epiz.*, 49: 99-105, 1958.
32. MAYO, J., LOMBARDO, J.H., SMOLKO, E.E., SEGURA, M., RIVENSON, S. Multiplicación del virus aftoso en roedores adultos previamente irradiados. *Rev. Inv. Agrop. Ser. 4*, 3 (6): 57-69, 1966.
33. NAGEL, H.G. El comportamiento del virus aftoso en animales lactantes de diferentes especies. *Gaceta Veterinaria*, 14 (76): 52-59, 1952.
34. NAGEL, H.C., PETERMANN, H.G. El comportamiento del virus aftoso en el embrión de pollo. *Gaceta Veterinaria*, 14 (76): 73-78, 1952.
35. PALMA, E.E. Acción del virus aftoso frente al *Cricetus cricetus* (Hamster). En: *Congreso Argentino de Fiebre Aftosa*, Buenos Aires, Argentina, 14-16 de mayo de 1957. p.131-142.
36. PATTY, R.E., COTTRAL, G.E., GAILUNAS, P. Comparative assay of foot-and-mouth disease virus in cattle, mice and cell cultures. *Bull. Off. int. Epiz.*, 63 (9-10): 1595-1606, 1965.
37. SCHMIDT FUNES, E. Receptivité du hamster au virus de la fièvre aphteuse. *Bull. Off. int. Epiz.*, 43: 756-760, 1955.
38. SCHUDEL, A.A., SADIR, A.M., ETCHEVERRIAGARAY, M.E., SAMUS, S., COLILA, O., RIVENSON, S. Susceptibility of South American non-primates to foot-and-mouth diseases virus. *Bull. Off. int. Epiz.* 93 (11-12): 1345-1350, 1981.
39. SKINNER, H.H., HENDERSON, W.M., BROOKSBY, J.B. Use of unweaned white mice in foot-and-mouth disease research. *Nature*, 169 (4306): 794-796, 1952.
40. SKINNER, H.H. Propagation of strains of foot-and-mouth disease virus in unweaned white mice. *Proc. Roy. Soc. Med.*, 44: 1041-1044, 1958.
41. SKINNER, H.H., SMITH, I.M., HOLLUM, S.E., KNIGHT, E.H. Attenuated strains of the virus of foot-and-mouth disease. Studies in small animals with strains of common origin modified by different methods. *Arch. Ges. Virusforschung*, 12: 472-486, 1962.
42. SKINNER, H.H., KNIGHT, E.H. Environmental factors influencing the response of guinea-pigs to modified strains of foot-and-mouth disease virus. *Bull. Off. int. Epiz.*, 61 (9-10): 1-21, 1964.
43. SUBAK-SHARPE, H. The quantitative study of foot-and-mouth disease virus in unweaned mice. 1. Studies of various factors affecting quantitative analysis. *Arch. Ges. Virusforschung*, 11: 1-38, 1961.
44. SUBAK-SHARPE, H. The quantitative study of foot-and-mouth disease virus in unweaned mice. 2. Studies with additional mouse strains and comparison of some methods of titration. *Arch. Ges. Virusforschung*, 11: 39-63, 1961.
45. SUBAK-SHARPE, H. The effect of passage history, route of inoculation, virus strain and host strain on the susceptibility of adult mice to the virus of foot-and-mouth disease. *Arch. Ges. Virusforschung*, 11 (3): 373-399, 1961.

## AISLAMIENTO DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EN ANIMALES DE LABORATORIO

### II. SUSCEPTIBILIDAD COMPARATIVA DE SEIS ESPECIES

O.J. DEGREGORIO<sup>1</sup>, V.M. VARELA-DIAZ<sup>2</sup>, M.S. SÖNDAHL<sup>2</sup>, H.S. PAIM<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires  
Avda. Chorroarín 280, Buenos Aires 1427, Argentina

<sup>2</sup>Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS)  
Caixa Postal 589, 20001-970 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

**Resumen.** Los hallazgos del presente estudio demuestran que el hamster es más susceptible a la infección por el virus de la fiebre aftosa que el ratón lactante, habitualmente empleado para efectuar aislamientos de este agente con fines diagnósticos. El hamster mostró una susceptibilidad superior a la inoculación de Aphthovirus obtenidos de bovinos infectados naturalmente. La comparación se basó en las manifestaciones clínicas, el tiempo medio de supervivencia, el porcentaje de mortalidad, la relación entre título y mortalidad, y el comportamiento de la infección en animales destetados. Le siguieron en orden descendente de susceptibilidad los meriones, conejos y cobayos lactantes, mientras que las ratas resistieron a la infección. Los resultados se analizan en términos de su implicancia diagnóstica para estudios epidemiológicos y el control de la enfermedad.

Una revisión analítica de la bibliografía sobre el uso de animales de laboratorio para el aislamiento del virus de la fiebre aftosa reveló las limitaciones de la información disponible (7). Sobre esta base se plantea la necesidad de realizar estudios sobre la susceptibilidad comparativa de las distintas especies de animales de laboratorio bajo idénticas condiciones fisiológicas, inoculados con el mismo agente, por la misma vía, con igual dosis, con el mismo volumen y, partiendo de un agente que no haya sufrido adaptación a ningún sistema de laboratorio.

El presente trabajo trata sobre los resultados de un estudio para determinar las ventajas y limitaciones relativas del empleo de ratones, ratas, cobayos, conejos, hamsters y meriones para el

aislamiento del virus de la fiebre aftosa, a partir de muestras epiteliales obtenidas de ganado infectado naturalmente.

#### MATERIALES Y METODOS

##### Material proveniente del campo

Se emplearon como inóculo epitelios linguales de bovinos infectados naturalmente con el virus de la fiebre aftosa. Las muestras de epitelio se colocaron en frascos, sumergidas en tampón de glicerina fosfatada. Una de las muestras (Nº 1) provenía de la localidad de Pehuajó, provincia de Buenos Aires, y las otras (Nºs 2 y 3) de la zona de Chapaleufú, provincia de la Pampa, República Argentina. Una dilución al 50% en medio de Vallée de cada virus se distribuyó a razón de 1,4 ml en frascos tipo Vial de 2 ml de volumen, que habían sido esterilizados con luz ultravioleta durante 15 minutos.

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

### Obtención de antígeno de las muestras epiteliales

Una alícuota (1,4 ml) de cada una de las muestras de epitelio se inoculó en un frasco *roller* de cultivo de células línea BHK<sub>21</sub> clon 13 con medio de mantenimiento Eagle y se incubó por 24 horas a 37°C. Ante la detección de un efecto citopático en la monocapa celular, el frasco se congeló a -20°C por 24 horas. Posteriormente, se descongeló en baño María a 37°C, se centrifugó a 4°C durante 10 minutos a 2000 rpm, y se recogió el sobrenadante. Las muestras se conservaron en la heladera a 4°C hasta su utilización como antígeno.

### Titulación de virus

El título viral en microplacas con camadas preformadas de células IBRS-2 clon 17 se definió en base a la recíproca de la dilución de dicho virus, expresado en el logaritmo de base 10 ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ), que producía efecto citopático en el 50% de las camadas de células ( $DI_{50}$ ) (3). El título obtenido en la muestra n° 1 fue  $10^3 DI_{50}/ml$ , en la muestra n° 2 fue  $10^{1.7} DI_{50}/ml$  y en la muestra n° 3 fue  $10^{0.85} DI_{50}/ml$ .

### Especies de animales

Las especies utilizadas fueron: ratones (*Mus musculus*) CF1/Br; ratas (*Rattus norvegicus*) Wistar Crw/Br; conejos (*Oryctolagus cuniculus*) New Zealand; hamsters (*Mesocricetus auratus*) Cpz:Syr; cobayos (*Cavia porcellus*) Hartley Hart, y meriones (*Meriones unguiculatus*) Cpz:Mon.

Cada grupo estaba constituido por diez animales lactantes de cuatro días de vida, la mitad de cada sexo. Se inocularon tres grupos de cada especie a fin de caracterizar la distribución de signos y de mortalidad, así como para estudiar la presentación de mortandad (expresada en horas postinoculación) por especie y sexo. En todo momento, los lactantes se mantuvieron en compañía de su madre.

Los estudios realizados en animales lactantes se repitieron, a fin de obtener mayor información, con animales destetados. A tal efecto, se emplearon ratones (*Mus musculus*) CF1/Br; hamsters (*Mesocricetus auratus*) Cpz:Syr y meriones

(*Meriones unguiculatus*) Cpz:Mon. Cada grupo estaba compuesto por ocho machos de una edad equivalente al tercer día de destetados. Se inocularon tres grupos de cada especie.

### Inoculación de animales

Los animales se inocularon con el correspondiente título de virus, en un volumen de 0,03 ml por vía intraperitoneal. En todos los casos se incluyeron como control grupos de animales inoculados solo con diluyente y, otros que no recibieron tratamiento alguno. Los datos sobre la presentación de signos clínicos y mortalidad se registraron durante un período de cinco días.

### Obtención de antígenos de animales muertos

Los individuos que murieron después de la inoculación experimental se evisceraron, se descartaron la piel, pelos y cabezas, y se procesaron según la técnica descrita para ratones (2). Se utilizó una parte de cada muestra para su tipificación y subtipificación, y otra se conservó a -20°C, para su posterior inoculación en cultivos celulares, a fin de corroborar la producción de efecto citopático por el virus.

### Fijación de complemento al 50%

Para la tipificación de todas las muestras, se realizó la prueba de  $FC_{50}$  (2). Los antígenos elaborados a partir de animales lactantes y destetados, así como de las muestras de epitelio bovino, se utilizaron en la dilución original de 1:5; aquellos obtenidos de cultivos celulares, en una dilución de 1:1.

Las muestras que mostraron actividad anticomplementaria se diluyeron 1:10 en tampón barbital, se clarificaron con 1 ml de cloroformo, y se centrifugaron a 2000 rpm por 20 minutos, antes de repetir la prueba de  $FC_{50}$ .

### Estudios estadísticos

Para determinar la posible existencia de diferencias significativas en mortandad entre las especies y por sexo se aplicó el Test *t* de Student (23).

Para estimar posibles diferencias significativas en morbilidad y mortalidad entre los grupos inoculados con distintos títulos virales se utilizaron estudios de Independencia, test  $X^2$  (22).

## RESULTADOS

### Tipificación de muestras epiteliales

La tipificación por  $FC_{50}$  de las muestras de epitelios linguales de bovinos confirmó que la muestra N° 1 correspondía antigénicamente al virus  $O_1$  Campos-Brasil/58 y, las muestras 2 y 3 al virus  $C_3$  Argentina/85.

### Estudios clínicos y de mortandad en animales lactantes

En el Cuadro 1 se presentan los resultados obtenidos en las especies inoculadas por la vía intraperitoneal con 0,03 ml del virus  $O_1$  (título medio de  $10^3$ /ml) o de virus  $C_3$  (título medio de  $10^{1.7}$ /ml). No se presentaron alteraciones en los animales controles inoculados solo con diluyente, ni en los controles lactantes normales.

Los signos clínicos en animales lactantes inoculados con  $O_1$  Campos fueron: para los cobayos, signos leves, principalmente debilidad y pelo hirsuto y para los ratones, debilidad del tren posterior y disnea *ante mortem*. Solo un hamster presentó signos de disnea y debilidad generalizada antes de

morir, mientras que los meriones mostraron algunos signos neurológicos, especialmente paresia del tren posterior y disnea. Solo un conejo, que sobrevivió hasta las 120 horas postinoculación, presentó paresia, parálisis del tren posterior, y debilidad generalizada antes de morir.

Con respecto al cuadro clínico observado en animales lactantes inoculados con  $C_3$  (título  $10^{1.7}$ /ml), los cobayos y los ratones presentaron signos leves, principalmente disnea, debilidad del tren posterior y pelo hirsuto. Aquellos hamsters que sobrevivieron hasta las 120 horas postinoculación presentaron disnea y debilidad del tren posterior, generalizada antes de morir. Finalmente, los meriones solo mostraron signos disneicos.

En el tercer grupo de animales lactantes inoculado por vía intraperitoneal con 0,03 ml del virus  $C_3$  (título medio de  $10^{0.85}$ /ml), los conejos, meriones, cobayos y ratas, los controles inoculados solo con diluyente, y los controles normales, no presentaron alteraciones ni mortalidad. Los ratones y los hamsters no presentaron signos clínicos, muriendo en forma súbita un ratón y todos los hamsters.

### Estudios clínicos y mortandad en animales destetados

En los animales destetados, inoculados con el virus  $O_1$  (título medio  $10^3$ /ml), la mortalidad fue del 12,5% en ratones, y del 100% en hamsters. Los meriones inoculados y los grupos controles no presentaron alteraciones.

Los signos clínicos en los hamsters incluyeron disnea, debilidad, parálisis de miembros anteriores y/o posteriores, opistótonos y conjuntivitis bilateral purulenta, seguidos de pérdida de sensibilidad y de conciencia y, finalmente de muerte. Los ratones no presentaron signos clínicos.

### Tipificación con antígenos virales de animales infectados

Los resultados de la tipificación en muestras de animales de laboratorio se presentan en el Cuadro 2. En general, el mejor antígeno para la  $FC_{50}$  se obtuvo del ratón lactante seguido por los de merión,

CUADRO 1. Mortalidad por Aphthovirus en animales lactantes.

	Virus $O_1$ Campos			Virus $C_3$ Indaial		
	Mortalidad (%)	Horas post-inoculación Media	D.S.	Mortalidad (%)	Horas post-inoculación Media	D.S.
Hamsters	100	49,0	18,4	100	84,0	22,7
Ratones	100	65,0	13,2	60	93,6	23,8
Meriones	100	60,0	12,4	60	84,0	12,5
Conejos	100	69,0	22,9	0	-	-
Cobayos	20	40,0	12,4	0	-	-
Ratas	0	-	-	0	-	-

**CUADRO 2. Tipificación de muestras de animales lactantes.**

	O <sub>1</sub> (título 10 <sup>3</sup> /ml)			C <sub>3</sub> (título 10 <sup>1.7</sup> /ml)			C <sub>3</sub> (título 10 <sup>0.85</sup> /ml)		
	Posi- tivas	Tipifi- cación directa	Anti- comple- mentarias	Posi- tivas	Tipifi- cación directa	Anti- comple- mentarias	Posi- tivas	Tipifi- cación directa	Anti- comple- mentarias
Ratones	5	4	1	5	4	1	1	-	1
Hamsters	5	3	2	5	3	2	5	2	3
Meriones	5	1	4	5	2	3	-	-	-
Conejos	5	1	4	-	-	-	-	-	-

conejo y hamster lactantes. Los estudios con muestras de animales destetados muertos presentaron resultados similares.

En todos los casos, las muestras presentaron efecto citopático al ser inoculadas en cultivos celulares. Los antígenos de origen animal y de cultivos celulares, se congelaron a -70°C por 90 días, conservando sus características antigénicas.

#### Estudios estadísticos

El test t de Student reveló que, de las diversas especies inoculadas con virus O<sub>1</sub> Campos (título de 10<sup>3</sup>/ml), únicamente los hamsters presentaron diferencias altamente significativas en cuanto a la mortandad (P<0,0005) en relación a los ratones (t:3,536) y los conejos (t:3,094), mientras que estas fueron significativas (P<0,025) con respecto a los meriones (t:2,134).

En cuanto al sexo, los hamsters machos presentaron diferencias altamente significativas (P<0,0005) en relación a los ratones machos (t:3,069) y conejos machos (t:3,092), y solo significativas (P<0,0025) en relación a los meriones machos (t:2,340). Solo los hamsters de sexo hembra presentaron diferencias significativas (P<0,0025) con respecto a los ratones de sexo hembra (t:2,194).

Con el virus C<sub>3</sub> (título de 10<sup>1.7</sup>/ml), no se observaron diferencias significativas entre las especies, ni tampoco entre los machos de las mismas.

Solo en el caso de los ratones hembra se presentaron diferencias significativas (P<0,0025) con respecto a los hamsters hembra (t:1,3979) y a los meriones hembra (t:2,259).

#### Estudios de morbi-mortalidad ante distintos títulos virales

Los ratones lactantes presentaron un valor de X<sup>2</sup> = 17,48 cuando se analizaron los resultados de mortalidad, y un valor de X<sup>2</sup> = 20,32 al estudiar la morbilidad después de la inoculación con los tres títulos del virus de la fiebre aftosa. Por su parte, la morbilidad y la mortalidad en los hamsters lactantes fue constante, con valores de X<sup>2</sup> = 0 y 2,08 respectivamente.

#### DISCUSION

El presente estudio aporta evidencia en apoyo de la hipótesis que los hamsters son más susceptibles a la inoculación por Aphthovirus provenientes de bovinos infectados naturalmente que el ratón lactante empleado tradicionalmente. En los hamsters lactantes se evidenció que el período de aparición de muerte era más breve y las manifestaciones clínicas más severas. También se observó que la mortalidad del 100% no estuvo asociada al título de virus inoculado y que ésta se expresaba también en los hamsters destetados. Por otra parte, la susceptibilidad de los meriones, conejos

y cobayos lactantes fue menor y las ratas resultaron refractarias a la infección.

En general, el cuadro clínico, el período de aparición de muerte y la mortalidad observados en algunas especies difieren de los registrados en la literatura (7). Esta aparente discrepancia se puede explicar si se considera que los Aphthovirus empleados en este trabajo eran muestras de campo mientras que en las publicaciones revisadas, las cepas habían sido modificadas por pasajes repetidos. De ahí que las manifestaciones más pronunciadas fueron aquellas que estaban asociadas a la inoculación de cobayos con cepas adaptadas a la especie homóloga (8,16); meriones destetados, con virus adaptados por 351 pasajes en cobayo (9); y ratones destetados, con virus modificados por pasajes sucesivos en ratones lactantes (4,13). Al respecto, se reconoce que los pasajes repetidos en cultivos celulares o animales de laboratorio pueden modificar sus características biológicas (7), por lo que su título, infectividad y virulencia pueden incrementarse para el nuevo sustrato, y reducirse para el sistema original.

Por el contrario, estas diferencias en la severidad de infecciones por cepas adaptadas y de campo no se manifestaron en los hamsters lactantes o destetados, ni tampoco en los ratones y meriones lactantes. Esto puede atribuirse a que estos animales poseen una alta susceptibilidad natural al virus de la fiebre aftosa, que se expresa indistintamente con cepas modificadas o de campo, acorde con lo observado en este estudio y en otros (9,11-13,16,20). Tampoco se detectaron estas discrepancias en el caso de los ratones y los conejos lactantes, lo que es compatible con un alto grado de resistencia natural de estos animales a la infección por cepas de campo, registrada en este trabajo así como en otros con Aphthovirus modificados (5,6,16,21).

La técnica de fijación de complemento está ampliamente difundida para el diagnóstico e identificación del virus de la fiebre aftosa. En aquellos casos en los que la muestra es inadecuada o los resultados no son concluyentes, se considera necesario incrementar la cantidad disponible de virus mediante pasajes en cultivos celulares, o en ratones lactantes de 2 a 7 días (17). La mayor

susceptibilidad del hamster demostrada en este estudio sugiere su utilidad en esas situaciones diagnósticas.

Además, el hecho de que el hamster normalmente se vea afectado por un menor número de enfermedades infecciosas que otros roedores de laboratorio (1) y la observación de que se le utiliza regularmente para el aislamiento selectivo de leptospiras a partir de muestras contaminadas (14,15), favorecen su empleo para aislar Aphthovirus de muestras de campo, particularmente cuando se trata de epitelios con un alto grado de contaminación. Otras características, como su fácil crianza y manejo, se prestan para su producción en bioterios de mediana infraestructura, distribuidos ampliamente en los países de América Latina y el Caribe (19).

Asimismo, los hamsters recién destetados, que revelaron una susceptibilidad comparable a la de los lactantes, superan a éstos en lo referente a factores relacionados con el manejo, crianza y desarrollo. Cabe señalar que estos son aspectos críticos, pues distorsionan los índices de morbimortalidad esperados, introducen desvíos significativos en las pruebas, y pueden condicionar los resultados. Otra ventaja de los hamsters recién destetados estriba en que, por su mayor peso, proveen muestras de tejido infectado de mayor tamaño que los hamsters y ratones lactantes.

En general, la inoculación de animales puede efectuarse en laboratorios periféricos de baja complejidad, que son mayoría en este continente (10,18,19). La replicación del virus en animales susceptibles posibilita la ampliación del número de partículas virales y, por ende, favorece su viabilidad durante el traslado de los laboratorios de campo hacia los laboratorios centrales, para estudios especializados. De ahí que sería de interés determinar el valor relativo del hamster y los cultivos celulares para el aislamiento de Aphthovirus. La frecuencia de actividad anti-complementaria en las muestras de hamster sugiere la necesidad de evaluar la efectividad comparativa de otras pruebas actualmente empleadas para la tipificación, en muestras de distintos animales de laboratorio.

## RECONOCIMIENTO

El autor principal presentó este trabajo en cumplimiento parcial de los requisitos para el título de *Magister en Salud Animal* de la Universidad de Buenos Aires.

## REFERENCIAS

1. CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE. *Guide to the care and use of experimental animal*. Canada, 1984. vol.2. cap. XIV-XV-XXI.
2. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA. *Manual de diagnóstico de laboratorio de las enfermedades vesiculares*. Rio de Janeiro, PANAFTOSA/OPS/OMS, 1986. 21 p. (Serie de manuales técnicos, 15).
3. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA. *Virusneutralización en microplacas con camadas preformadas de células IBRS-2 (TNC) para el control de potencia de la vacuna anti-aftosa*. Laboratorio de Referencia. Protocolo. Rio de Janeiro, PANAFTOSA/OPS/OMS, 1992.
4. CUNHA, R.G., EICHHORN, E.A. Influence of cortisone on susceptibility of adult mice to foot-and-mouth disease virus. *Am. J. Vet. Res.* :149-151, 1954.
5. CUNHA, R.G., EICHHORN, E.A. Studies on rabbit-adapted foot-and-mouth disease virus. I. Propagation and pathogenicity. *Am. J. Vet. Res.* :133-138, 1959.
6. DACORSO FILHO, P., CUNHA, R.G. Lesões observadas em coelhos recém-nascidos inoculados com amostras de tres tipos de virus de febre aftosa. *Bol. Soc. Bras. Med. Vet.*, 19: 91-102, 1951.
7. DEGREGORIO, O.J.; VARELA-DIAZ, V.M. Aislamiento del virus de la fiebre aftosa en animales de laboratorio I. Limitaciones de la información disponible. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 58: 87-91, 1992.
8. GARCIA MATA, E., FEDERER, K.E., PIZZI, L., ARAMBURU, H.G. Acción patógena del virus aftoso en neonatos de diferentes especies. *Gaceta Veterinaria*, 17 (94): 57-64, 1955.
9. GIROUD, P., CIACCIO, G. Adaptation au mérimon du virus aphteux. *C.R. Soc. Biol., Paris.*, 148: 31-32, 1954.
10. INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERACION AGRICOLA. Red Interamericana de Laboratorios de Salud Animal. *Informe de situación de los laboratorios de salud animal. Programa V*. San José, Costa Rica, IICA, 1988. p.1-36.
11. KORN, G. Die erkrankung des goldhamsters, *mesocricetus auratus*, au maul- und-klauenseuche. *Arch. Exp. Vet. Med.*, 6 (Suppl.): 36-37, 1952.
12. KORN, G. Die pathogenese und histogenese der maul- und-klauenseuche des goldhamsters, *mesocricetus auratus*. *Arch. Exp. Vet. Med.*, 7: 192-225, 1953.
13. MAYO, J., LOMBARDO, J.H., SMOLKO, E.E., SEGURA, M., RIVENSON, S. Multiplicación del virus aftoso en roedores adultos previamente irradiados. *Rev. Invest. Agrop. Ser. 4*, 3 (6): 57-69, 1966.
14. MYERS, D.M., VARELA-DIAZ, V.M. Selective isolation of leptospiras from contaminated material by incorporation of neomycin to culture media. *Appl. Microbiol.*, 25 (5):781-786, 1973.
15. MYERS, D.M. *Manual de métodos para el diagnóstico de laboratorio de leptospirosis*. Argentina, CEPANZO OPS/OMS, 1981. (Nota Técnica, 30).
16. NAGEL, H.G. El comportamiento del virus aftoso en animales lactantes diferentes especies. *Gaceta Veterinaria*, 14 (76): 52-59, 1952.
17. OFICINA INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS. *Foot-and-mouth disease: manual de referencia*. Paris, OIE. 1990. vol II, p.1/12-12/12.
18. ORELLANO, C., FRANK, J., HOWARTH, J.A., PALACIOS, C., SEATON, V.A., ACHA, P., MURNANE, T.G. *Informe de la Comisión de Evaluación de los Laboratorios de Diagnóstico Veterinario en las Américas*. San José, Costa Rica, IICA, 1982. 88p. (IICA. Serie salud animal, Pub. Cien, 2).
19. ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. *Diagnóstico de la salud animal en las Américas*. Washington. DC, OPS/OMS, 1983. p. 126-130. (Pub. Cien, 452).
20. SCHMIDT FUNES, E. Receptivité du hamster au virus de la fievre aphteuse. *Bull. Off. int. Epiz.*, 43: 756-760, 1955.
21. SKINNER, H.H., HENDERSON, W.M., BROOKSBY, J.B. Use of unweaned white mice in foot-and-mouth disease research. *Nature*, 169 (4306): 794-796. 1952.
22. SNEDECOR, G.W., COCHRAN, W.G. 1980. *Métodos estadísticos*. 7ª ed. México, Comp. Edit. Continental S.A., 1980. p. 17-53.
23. STEEL, R.G.D., TORRIE, J.H. *Bioestadística: principios y procedimientos*. 2ª ed. New York, Mac.Graw-Hill, 1986. p. 83-116.

## ISOLATION OF FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS IN LABORATORY ANIMALS II. COMPARATIVE SUSCEPTIBILITY OF SIX SPECIES

O.J. DEGREGORIO<sup>1</sup>, V.M. VARELA-DIAZ<sup>2</sup>, M.S. SONDHAL<sup>2</sup>, H.S. PAIM<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires

Avda. Chorroarín 280, Buenos Aires 1427, Argentina

<sup>2</sup>Pan American Foot-and-Mouth Disease Center (PAHO/WHO)

P.O. Box 589, 20001-970 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

**Summary.** The present findings demonstrate that the hamster is more susceptible to infection with foot-and-mouth disease virus than the suckling mouse, traditionally used for isolating this agent. Hamsters were more sensitive to the inoculation of Aphthovirus obtained from bovines with natural infections. The comparison was based on clinical manifestations, mean survival time, percent mortality, relationship between titer and mortality, and evolution of infection in weanlings. Following in decreasing order of susceptibility were suckling gerbils, rabbits and guinea pigs, while rats were refractory. The results are discussed in terms of their diagnostic implications for epidemiologic studies and disease control.

An analytical review of the bibliography on the use of laboratory animals for isolating foot-and-mouth disease virus revealed the limitations of current knowledge (7). On this basis, the need to carry out studies on the comparative susceptibility of different laboratory animal species under identical physiologic conditions, inoculated by the same route, with the same dose and volume of a field virus unadapted to any laboratory system was indicated.

Accordingly, this paper deals with the results of a study to assess the relative advantages and limitations of inoculating mice, rats, guinea pigs, rabbits, hamsters and gerbils to isolate Aphthovirus from epithelial samples obtained from cattle with natural infections.

### MATERIALS AND METHODS

#### Field samples

Epithelial samples were collected from the tongues of bovines infected naturally with foot-and-mouth disease virus, for use as inocula. Samples were placed in jars and covered with glycerine phosphate buffer. One of them (Nº. 1) was obtained in the locality of Pehuajó, Province of Buenos Aires, and others (Nos. 2 and 3) in the area of Chapaleufú, Province of La Pampa, Argentina. A 50 per cent dilution (1.4 ml) of each virus in Vallée medium was distributed in 2 ml, vials which had been sterilized under ultraviolet light for 15 minutes.

#### Antigen from epithelial samples

An aliquot (1.4 ml) of each epithelium was inoculated into roller bottles containing BHK<sub>21</sub> clone 13 culture cells in Eagle's maintenance me-

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



dium and incubated for 24 hours at 37°C. Following detection of cytopathic effect on the cell layer, bottles were frozen at -20°C for 24 hours. Subsequently, they were thawed in a steam bath at 37°C, centrifuged at 4°C for ten minutes at 2000 G's and the supernatant removed. All samples were kept refrigerated at 4°C until ready for use as antigen.

#### Viral titrations

Viral titers in microplates with preformed layers of IBRS-2 clone 17 cells were defined on the basis of the reciprocal of the viral dilution, expressed as logarithm base 10 ( $10^{-1}$  to  $10^{-5}$ ), that produced a cytopathic effect in 50 percent of cell layers ( $10^{50}ID_{50}$  (3)). The titer obtained was  $10^{3.5}ID_{50}/ml$  for sample No. 1,  $10^{4.5}ID_{50}/ml$  for sample No. 2; and  $10^{6.5}ID_{50}/ml$  for sample No. 3.

#### Laboratory animal species

The species used were: CF1/Br mice (*Mus musculus*); Wistar Crw/Br rats (*Rattus norvegicus*); New Zealand white rabbits (*Oryctolagus cuniculus*); Cpz:Syr hamsters (*Mesocricetus auratus*); Hartley Hart guinea pigs (*Cavia porcellus*) and Cpz: Mon gerbils (*Meriones unguiculatus*).

Each group consisted of ten four-day old suckling animals, half of each sex. Three groups of each species were inoculated to characterize clinical signs and to register the appearance of mortality (expressed in hours post-inoculation) by sex and species. Suckling animals were kept with their mothers at all times.

For comparative purposes, similar studies were carried out using weaned animals to collect data using methods described for suckling animals. Species used were CF1/Br mice (*Mus musculus*); Cpz:Syr hamsters (*Mesocricetus auratus*); and Cpz:Mon gerbils (*Meriones unguiculatus*). Each group consisted of eight males, and their age was standardized at the third day after weaning. Three of these groups were inoculated for each species.

#### Animal inoculations

Animals were inoculated with the corresponding virus titer in a 0.03 ml volume, by the intraperitoneal route. In all cases, groups of animals were inoculated solely with diluent, and others were left untreated, for use as controls. Data on the occurrence of clinical signs and mortality were recorded over a five-day period.

#### Antigen from dead animals

Individuals which died after inoculation were eviscerated, and the skin, hair and heads were discarded. Subsequently, all animals were processed according to the technique described for mice (2). Part of each sample was used for typing and subtyping and the rest frozen at -20°C for subsequent inoculation of cell cultures to confirm the production of cytopathic effect by the virus.

#### Complement fixation

Typing of all samples was carried out by the complement fixation test using 50 per cent hemolysis ( $CF_{50}$ ), as described elsewhere (2). Antigens prepared from suckling and weaned animals, and from bovine epithelium samples were used at the original 1:5 dilution. Antigens obtained from cell cultures were used at a 1:1 dilution.

Samples with anticomplement activity were diluted 1:10 in barbital buffer, clarified with 1 ml of chloroform and centrifuged at 2000 for 20 minutes, before repeating  $CF_{50}$  tests.

#### Statistical studies

The Student's t test (23) was applied to determine the possible existence of significant differences in mortality between species and by sex.

To estimate possible significant differences in morbidity and mortality between groups inoculated with various viral titers, studies of independence,  $X^2$  tests (32) were used.

## RESULTS

### Typing of epithelial samples

Typing of bovine tongue epithelium samples by CF<sub>50</sub> confirmed that sample N<sup>o</sup>. 1 corresponded to O<sub>1</sub> Campos-Brasil/58 virus, and samples Nos. 2 and 3 to C<sub>3</sub> Indaial-Brasil/71-Argentina/85 virus.

TABLE 1. Mortality by Aphthovirus in suckling laboratory animals.

	Virus O <sub>1</sub> Campos		Virus C <sub>3</sub> Indaial			
	Mortality (%)	Hours post-inoculation Median S.D.	Mortality (%)	Hours post-inoculation Median S.D.	S.D.	
Hamsters	100	49.0	18.4	100	84.0	22.7
Mice	100	65.0	13.2	60	93.6	23.8
Gerbits	100	60.0	12.4	60	84.0	12.5
Rabbits	100	69.0	22.9	0	-	-
Guinea Pigs	20	40.0	12.4	0	-	-
Rats	0	-	-	0	-	-

### Clinical studies and mortality in suckling animals

Mortality data obtained for species inoculated intraperitoneally with 0.03 ml of O<sub>1</sub> virus (mean titer 10<sup>3</sup>/ml) and with C<sub>3</sub> virus (mean titer of 10<sup>1.7</sup>/ml) are shown in Table 1. No alterations were present in controls which received diluent alone or in normal suckling animals.

Clinical signs recorded in suckling animals after inoculating O<sub>1</sub> Campos virus were: for guinea pigs, minor signs, mainly weakness and hirsute hair, and for mice, posterior weakness and *ante-mortem* dyspnea. Only one hamster showed dyspnea and general weakness before death, while gerbils showed neurologic signs, mainly posterior paresia and dyspnea. One rabbit, which survived to 120 hours post-inoculation, presented paresia, posterior paralysis and generalized weakness before dying.

Clinical signs following suckling animal inoculations with C<sub>3</sub> virus (titer 10<sup>1.7</sup>/ml) were slight in guinea pigs and mice, and consisted mainly of dyspnea, posterior weakness and hirsutism. Hamsters surviving more than 120 hours after inocula-

tion showed dyspnea and posterior weakness before death. Gerbils showed only signs of dyspnea.

In the third group of suckling animals inoculated intraperitoneally with 0.03 ml of C<sub>3</sub> virus (mean titer of 10<sup>0.85</sup>/ml), no alterations or mortality were recorded in rabbits, gerbils, guinea pigs and rats, nor in diluent or normal controls. Mice and hamsters did not show clinical signs, although sudden death was recorded in all hamsters and one mouse.

### Clinical studies and mortality in weaned animals

In weaned animals, mortality was 12.5 per cent for mice, and 100 per cent for hamsters following inoculation with O<sub>1</sub> virus (mean titer 10<sup>3</sup>/ml). In contrast, inoculated gerbils and control groups were unaffected.

Clinical signs in weaned hamsters included dyspnea, weakness, anterior and posterior paralysis, opisthotonus and purulent bilateral conjunctivitis, followed by loss of consciousness, and finally death. Suckling mice control groups showed no signs of infection.

### Typing with viral antigens from infected animals

Typing results on laboratory animal samples are shown in Table 2. In general, the best CF<sub>50</sub> test antigen was that collected from suckling mice, followed by that from suckling gerbils, rabbits and hamsters. Similar results were obtained with samples from dead weaned animals.

In all cases, samples produced cytopathic effect in tissue cultures. Antigens of animal origin and those from tissue cultures retained their antigenic characteristics when frozen at -70°C for 90 days.

### Statistical studies

Student's t tests on data from animals inoculated with O<sub>1</sub> Campos (titer of 10<sup>3</sup>/ml) revealed that only hamsters presented highly significant differences in mortality (P<0.0005) in relation to mice (t:3.536) and rabbits (t:3.094), while these were significant (P<0.0025) with respect to gerbils (t:2.134).

TABLE 2. Aphthovirus typing of samples from suckling laboratory animals.

	O <sub>1</sub> (titer 10 <sup>3</sup> /ml)			C <sub>3</sub> (titer 10 <sup>1.7</sup> /ml)			C <sub>3</sub> (titer 10 <sup>0.25</sup> /ml)		
	Posi- tive	Direct Typing	Anti- comple- mentary	Posi- tive	Direct Typing	Anti- comple- mentary	Posi- tive	Direct Typing	Anti- comple- mentary
Mice	5	4	1	5	4	1	1	-	1
Hamsters	5	3	2	5	3	2	5	2	3
Gerbils	5	1	4	5	2	3	-	-	-
Rabbits	5	1	4	-	-	-	-	-	-

In relation to sex, male hamsters showed highly significant differences ( $P < 0.0005$ ) in relation to male mice ( $t: 3.069$ ) and rabbits ( $t: 3.092$ ), and only significant differences ( $P < 0.0025$ ) in relation to male gerbils ( $t: 2.340$ ). Only female hamsters showed significant differences ( $P < 0.0025$ ) with respect to mice ( $t: 2.194$ ).

No significant differences among species or among their males were observed after inoculation with C<sub>3</sub> Indaial (titer of 10<sup>1.7</sup>/ml). Only in the case of females, mice showed significant differences ( $P < 0.0025$ ) in relation to hamsters ( $t: 1.3979$ ) and gerbils ( $t: 2.259$ ).

#### Morbidity and mortality at different viral titers

After inoculation of animals with the three titers of Aphthovirus, a value for  $X^2 = 17.48$  was obtained when suckling mouse mortality results were analyzed, and a value of  $X^2 = 20.32$  when morbidity was studied. On the other hand, these values were  $X^2 = 0$  and 2.08, respectively, for suckling hamsters.

### DISCUSSION

The present study provided evidence in support of the hypothesis that hamsters are more susceptible to inoculation by Aphthovirus obtained from bovines with natural infections than the com-

monly-employed suckling mice. In suckling hamsters, the *ante-mortem* time period was shorter and clinical manifestations more severe. Furthermore, it was observed that the onset of 100 per cent mortality was not associated to the viral titer of the inoculum and that it also occurred in weaned hamsters. In contrast, susceptibility was reduced in suckling gerbils, rabbits and guinea pigs while rats resisted infection.

For some species, clinical findings, mean survival times and mortality differed from those recorded in the literature (7). In the latter, the more pronounced manifestations were associated with inoculation of guinea pigs with viruses adapted to the homologous species (8,16); weaned gerbils, with virus adapted by 351 passages in guinea pigs (9); and weaned mice, with viruses modified by successive passages in suckling mice (4,13). These apparent discrepancies may be explained by considering that the Aphthovirus employed in this study were field samples, while other publications dealt with strains modified by repeated passages. Along these lines, it is recognized that the repeated passage of Aphthoviruses in tissue cultures or laboratory animals may modify their biological characteristics (7). Consequently, their titer, infectivity and virulence may increase in new substrates, and diminish for the original system.

In contrast, these differences in the severity of infections by field and adapted strains were not applicable to suckling or weaned hamsters, nor to

suckling mice or gerbils. This observation may be accounted for in terms of their having a high natural susceptibility to Aphthovirus, which does not allow the expression of differences between field and laboratory strains, as observed in this study and in others (9, 11-13, 16, 20). Similarly, these discrepancies were not seen with suckling rats or rabbits, an observation in agreement with their high degree of natural resistance to infection with field strains, as observed in this study and in other papers with modified viruses (5, 6, 16, 21).

The complement fixation test is widely used for the diagnosis and identification of foot-and-mouth disease viruses. However, in those cases in which the sample is inadequate, or the results inconclusive, it is deemed necessary to increase the available quantity of virus by means of passages in cell cultures, or in 2-7 day-old suckling mice (17). Accordingly, the greater susceptibility recorded for hamsters vis-à-vis other laboratory animals in the present study is suggestive of their usefulness in such diagnostic situations.

In general, the proposal to use hamsters to isolate Aphthovirus from field samples, particularly from highly contaminated epithelia, receives support from other considerations. These include the fact that the hamster is normally affected by fewer infectious diseases than other laboratory rodents (1) and the observation that these animals are used regularly for the selective isolation of leptospiras from contaminated samples (14, 15). Other characteristics of hamsters, such as their easy raising and management, render them suitable for production by laboratory animal facilities with an average infrastructure, as those which are distributed widely throughout Latin American and Caribbean countries (19).

Furthermore, recently weaned hamsters, whose susceptibility was comparable to that of suckling mice, clearly surpass the latter in factors related to management, breeding and development. These aspects are critical since they may distort expected morbidity and mortality indices, introduce significant deviations in trials, and consequently, condition results. Another advantage is that, because of their greater weight, they provide larger samples of infected tissues greater than suckling mice or hamsters.

In general, animal inoculations may be carried out in peripheral laboratories of low complexity, which predominate throughout Latin American and Caribbean countries (10, 18, 19). Viral replication in susceptible animals allow the quantities of available viral particles to increase, and accordingly, favours their viability during transit from field to central laboratories, for specialized studies. On this basis, it would be of interest to determine the relative value of hamsters and cell cultures for isolating Aphthovirus. The frequency of anti-complementary activity in samples from hamsters suggests the need to obtain data on the comparative effectiveness of other techniques used currently for typing Aphthovirus, in samples from different laboratory animal species.

#### ACKNOWLEDGEMENT

This work was presented by the senior author in partial fulfillment of the requirement for the degree of *Magister* in Animal Health of the University of Buenos Aires.

#### REFERENCES

1. CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE. *Guide to the care and use of experimental animal*. Canada, 1984. vol.2. cap. XIV-XV-XXI.
2. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA. *Manual de diagnóstico de laboratorio de las enfermedades vesiculares*. Rio de Janeiro, PANAFTOSA/OPS/OMS, 1986. 21 p. (Serie de manuales técnicos, 15).
3. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA. *Virusneutralización en microplacas con camadas preformadas de células IBRS-2 (TNC) para el control de potencia de la vacuna anti-aftosa*. Laboratorio de Referencia. Protocolo. Rio de Janeiro, PANAFTOSA/OPS/OMS, 1992.
4. CUNHA, R.G., EICHHORN, E.A. Influence of cortisone on susceptibility of adult mice to foot-and-mouth disease virus. *Am. J. Vet. Res.* :149-151, 1954.
5. CUNHA, R.G., EICHHORN, E.A. Studies on rabbit-adapted foot-and-mouth disease virus. I. Propagation and pathogenicity. *Am. J. Vet. Res.* : 133-138, 1959.

6. DACORSO FILHO, P., CUNHA, R.G. Lesões observadas em coelhos recém-nascidos inoculados com amostras de tres tipos de vírus de febre aftosa. *Bol. Soc. Bras. Med. Vet.*, 19: 91-102, 1951.
7. DEGREGORIO, O.J.; VARELA-DIAZ, V.M. Aislamiento del virus de la fiebre aftosa en animales de laboratorio I. Limitaciones de la información disponible. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 58: 92-96, 1992.
8. GARCIA MATA, E., FEDERER, K.E., PIZZI, L., ARAMBURU, H.G. Acción patógena del virus aftoso en neonatos de diferentes especies. *Gaceta Veterinaria*, 17 (94): 57-64, 1955.
9. GIROUD, P., CIACCIO, G. Adaptation au méridion du virus aphteux. *C.R. Soc. Biol., Paris.*, 148: 31-32, 1954.
10. INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERACION AGRICOLA. Red Interamericana de Laboratorios de Salud Animal. *Informe de situación de los laboratorios de salud animal. Programa V.* San José, Costa Rica, IICA, 1988. p.1-36.
11. KORN, G. Die erkrankung des goldhamsters, mesocricetus auratus, au maul- und-klauenseuche. *Arch. Exp. Vet. Med.*, 6 (Suppl.): 36-37, 1952.
12. KORN, G. Die pathogenese und histogenese der maul- und-klauenseuche des goldhamsters, mesocricetus auratus. *Arch. Exp. Vet. Med.*, 7: 192-225, 1953.
13. MAYO, J., LOMBARDO, J.H., SMOLKO, E.E., SEGURA, M., RIVENSON, S. Multiplicación del virus aftoso en roedores adultos previamente irradiados. *Rev. Invest. Agrop. Ser. 4*, 3 (6): 57-69, 1966.
14. MYERS, D.M., VARELA-DIAZ, V.M. Selective isolation of leptospiras from contaminated material by incorporation of neomycin to culture media. *Appl. Microbiol.*, 25 (5):781-786, 1973.
15. MYERS, D.M. *Manual de métodos para el diagnóstico de laboratorio de leptospirosis.* Argentina, CEPANZO OPS/OMS, 1981. (Nota Técnica, 30).
16. NAGEL, H.G. El comportamiento del virus aftoso en animales lactantes diferentes especies. *Gaceta Veterinaria*, 14 (76): 52-59, 1952.
17. OFICINA INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS. *Foot-and-mouth disease: manual de referencia.* Paris, OIE. 1990. vol II, p.1/12-12/12.
18. ORELLANO, C., FRANK, J., HOWARTH, J.A., PALACIOS, C., SEATON, V.A., ACHA, P., MURNANE, T.G. *Informe de la Comisión de Evaluación de los Laboratorios de Diagnóstico Veterinario en las Américas.* San José, Costa Rica, IICA, 1982. 88p. (IICA. Serie salud animal, Pub. Cien, 2).
19. ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. *Diagnóstico de la salud animal en las Américas.* Washington. DC, OPS/OMS, 1983. p. 126-130. (Pub. Cien, 452).
20. SCHMIDT FUNES, E. Receptivité du hamster au virus de la fievre aphteuse. *Bull. Off. int. Epiz.*, 43: 756-760, 1955.
21. SKINNER, H.H., HENDERSON, W.M., BROOKSBY, J.B. Use of unweaned white mice in foot-and-mouth disease research. *Nature*, 169 (4306): 794-796. 1952.
22. SNEDECOR, G.W., COCHRAN, W.G. 1980. *Métodos estadísticos.* 7ª ed. México, Comp. Edit. Continental S.A., 1980. p. 17-53.
23. STEEL, R.G.D., TORRIE, J.H. *Bioestadística: principios y procedimientos.* 2ª ed. New York, Mac.Graw-Hill, 1986. p. 83-116.

## CARACTERIZACION MOLECULAR DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA USADAS PARA LA PRODUCCION DE VACUNAS EN SUDAMERICA

I.E. BERGMANN, V. MALIRAT, P.J.V. PEREIRA

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS)  
Caixa Postal 589, 20001-970 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

**Resumen.** Las cepas del virus de la fiebre aftosa usadas actualmente para la producción de vacunas en Sudamérica fueron caracterizadas por mapeamiento bidimensional ARNasa T, *finger-printing* y por secuenciación de nucleótidos directamente del cADN correspondiente a la región que codifica para la mitad carboxiterminal de la VP<sub>1</sub> (aproximadamente 290 nucleótidos). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con aquellas determinadas previamente para algunas de estas cepas por otros laboratorios. Los resultados presentados constituyen la base de un banco de datos para evaluar el grado de homología entre virus de campo y vacunales, y para monitorear la estabilidad genética de cepas durante la producción y control de vacunas.

Como ocurre en otros virus a ARN, una característica importante del virus de la fiebre aftosa (VFA) es su considerable variabilidad genética (13), responsable de la compleja serología de este virus. El VFA comprende siete tipos inmunológicamente diferentes: O, A, C, SAT-1, SAT-2, SAT-3 y Asia-1, cada uno de los cuales puede subdividirse en un número creciente de subtipos.

El avance de los programas de erradicación de la fiebre aftosa en los países de Sudamérica enfatiza el requerimiento de estrategias de control que incluyan el rastreo de posibles orígenes de virus infeccioso, con el fin de identificar y eliminar posibles focos de la enfermedad. Por lo tanto, deben implementarse métodos de diagnóstico que permitan no sólo discriminar entre serotipos y subtipos, sino también entre distintas variantes del mismo subtipo.

En contraposición a los ensayos serológicos, los métodos moleculares proporcionan herramientas valiosas para establecer relaciones inequívocas entre cepas. Cuando se comparan cepas de virus a ARN estrechamente relacionadas, el mapeamiento bidimensional ARNasa T, constituye un método adecuado (10, 11, 12, 29). De hecho, éste ha sido aplicado para evaluar las homologías genómicas entre cepas de campo y vacunales. Contrariamente a la situación de Sudamérica (4), en Europa han sido señaladas relaciones estrechas al comparar la mayoría de las cepas aisladas en el campo con las vacunales (7, 16).

Asimismo, puede obtenerse información de como se reflejan las diferencias genómicas en los dominios antigénicos, por la determinación de la secuencia de nucleótidos de la proteína capsidial VP<sub>1</sub>. Los principales sitios inmunogénicos han sido reconocidos en la región que abarca aproximadamente los aminoácidos 138-158, y en los residuos carboxiterminales de esta proteína (6, 20, 22, 23, 28, 31).

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

Concordando con los resultados establecidos por mapeamiento T<sub>1</sub>, el secuenciamiento de nucleótidos del gen que codifica para la VP<sub>1</sub> reveló que la mayoría de las cepas responsables de brotes en Europa estaban íntimamente relacionadas con las vacunales (3, 7).

En contraposición al análisis por *finger-printing* (1), el secuenciamiento de nucleótidos permite la comparación entre genomas distantes. De hecho se pueden construir árboles filogenéticos que relacionan virus de serotipos O, A y C, basándose en la secuencia de nucleótidos del gen de la VP<sub>1</sub> (14, 15, 19).

Este trabajo registra la secuencia de nucleótidos y la deducida secuencia de aminoácidos de la región que codifica para la mitad carboxiterminal de la VP<sub>1</sub> de las cepas de Sudamérica usadas actualmente para la producción de vacunas.

Adicionalmente, se presenta la actualización de los mapas T<sub>1</sub> de las referidas cepas.

## MATERIALES Y METODOS

### Células, virus e infecciones

Las cepas virales se obtuvieron de la colección del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa y se pasaron de 2 a 3 veces en cultivos de monocapas de células de riñón de cría de hamster (BHK-21, clon 13) en ausencia de suero.

El Cuadro 1 resume la información sobre las cepas de serotipos O, A y C usadas actualmente en la producción de vacunas en los distintos países de Sudamérica, incluyendo el número de dosis producidas y aplicadas en cada país.

CUADRO 1. Cepas usadas para la producción de vacuna contra VFA en Sudamérica.

País	Cepa			Producción de Vacunas en 1992 (dosis x 1000)	Nº de dosis totales aplicadas en 1992 (dosis x 1000)
	O	A	C		
Argentina	O <sub>1</sub> Cas/67 O <sub>1</sub> C/58	A <sub>79</sub> Arg/79 A <sub>81</sub> Arg/87	C <sub>3</sub> Arg/85	110.094,8	115.690,5
Brasil	O <sub>1</sub> C/58	A <sub>24</sub> Cruz/55	C <sub>3</sub> Ind/71	181.393,6	159.060,8
Colombia	O <sub>1</sub> C/58	A <sub>24</sub> Cruz/55	-	13.390,7	15.116,4
Ecuador	O <sub>1</sub> C/58	A <sub>24</sub> Cruz/55	-	31,0	685,0
Paraguay	O <sub>1</sub> C/58	A <sub>24</sub> Cruz/55	C <sub>3</sub> Res/55	9.998,0	6.652,3
Perú	O <sub>1</sub> C/58	A <sub>24</sub> Cruz/55	C <sub>3</sub> Res/55	500,0	606,0
Uruguay	O <sub>1</sub> C/58	A <sub>24</sub> Cruz/55	C <sub>3</sub> Ind/71	20.341,5	13.528,6
Venezuela	O <sub>1</sub> C/58	A <sub>24</sub> Cruz/55	-	5.629,7	9.722,8

Fuente: Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. Situación de los programas de control de la fiebre aftosa. América del Sur, 1992 - Rio de Janeiro, PANAF-TOSA, 1993. Cuadro 4.

Abreviaturas:

O<sub>1</sub> Cas/67, O<sub>1</sub> Caseros Arg2/67; O<sub>1</sub> C/58, O<sub>1</sub> Campos Br1/58; A<sub>79</sub> Arg/79, A-79 Argentina/79; A<sub>81</sub> Arg/87, A-81 Castellanos Arg/87; A<sub>24</sub> Cruz/55, A<sub>24</sub> Cruzeiro Br1/55; C<sub>3</sub> Arg/85, C<sub>3</sub> Argentina/85; C<sub>3</sub> Ind/71, C<sub>3</sub> Indaial Br1/71; C<sub>3</sub> Res/55, C<sub>3</sub> Resende Br/55.

### Aislamiento del ARN y *fingerprinting* de los fragmentos resistentes a ARNasa T<sub>1</sub>.

El marcado radioactivo del ARN del VFA con <sup>32</sup>P y la extracción del ARN citoplasmático se realizaron esencialmente como fuera informado anteriormente (2). El método usado para la separación de los oligonucleótidos resistentes a ARNasa T<sub>1</sub> fue una modificación de técnicas anteriores y se llevó a cabo como fuera descrito (5,17).

### Secuenciamiento de la región que codifica para VP<sub>1</sub>

El VFA fue purificado por ultracentrifugación a través de un colchón de sacarosa. La suspensión viral ajustada a una concentración final de 2% de dodecil sulfato de sodio, se extrajo dos veces con igual volumen de fenol neutralizado al 80% (p/p): cloroformo: alcohol isoamílico (50:49:1). El ARN se precipitó por el agregado de dos volúmenes de etanol.

Alternativamente, un frasco de plástico de 175 cm<sup>2</sup> conteniendo una monocapa confluyente de células BHK-21 fue inoculado con 10 UFP/célula e incubado hasta observarse efecto citopático en la mayoría de las células (generalmente entre 5 y 7 horas luego de la infección). El extracto citoplasmático se obtuvo por la adición a la monocapa celular de 10 ml de tampón NET (100 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 7.5, 1 mM EDTA) conteniendo 0.05% Tritón X-100. Luego de 5 min a 4°C, los núcleos y otros residuos celulares se descartaron por medio de centrifugación a 2000 rpm por 10 min. El ARN se extrajo y se purificó como fue descrito anteriormente.

Los oligonucleótidos iniciadores se seleccionaron tal que fueran complementarios a las secuencias más conservadas entre los distintos serotipos, a distancias de 200 a 300 nucleótidos en el genoma viral. Para los serotipos O y A, los iniciadores usados fueron complementarios a las posiciones 478 a 500 de la región que codifica para

la VP<sub>1</sub> y a las posiciones 34 a 54 del gen de la 2A. Aunque estos oligonucleótidos son complementarios a la secuencia del virus O<sub>1</sub> C/58 y no se ajustan en todas las posiciones a la secuencia correspondiente de las cepas tipo A, la síntesis de cADN funcionó bien con ambos serotipos. Para el serotipo C, el iniciador utilizado en el gen de la 2A fue el mismo que para los serotipos O y A. Aquel complementario a la región codificante de la VP<sub>1</sub> correspondió a las posiciones 471 a 491.

Los oligonucleótidos fueron marcados radioactivamente en su extremo 5' con polinucleótido quinasa y [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (3000 mCi/ $\mu$ mol) (New England Nuclear Corp.\*) como fuera descrito anteriormente (21). Para la síntesis de cADN, 3 pmoles del oligonucleótido marcado fueron incubados con aproximadamente 10  $\mu$ g de ARN parcialmente purificado (o con 100  $\mu$ g de ARN total de células infectadas con VFA) en 50  $\mu$ l de 50 mM Tris/HCl pH 8.3, 60 mM KCl, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM de cada uno de los cuatro deoxinucleótido trifosfato, 10 mM ditioneitol y 10 U de transcriptasa reversa del virus de la mioblastosis aviaria (Promega Biotec.\*). La síntesis de cADN se realizó durante 20 min a 42°C. La reacción fue detenida con el agregado de 2  $\mu$ g/ $\mu$ l de ARNasa A, libre de ADNasa, incubando por otros 15 min. El cADN fue seleccionado de acuerdo a su tamaño en geles de agarosa al 1%, de forma tal que únicamente las moléculas mayores de aproximadamente 800 nucleótidos fueron usadas para la secuenciación.

Las secuencias de nucleótidos fueron determinadas por el método químico de Maxam y Gilbert (21). Las muestras fueron resuspendidas en formamida al 80%, 1 mM EDTA, 10 mM NaOH y 0.12% de azul de bromofenol.

Alícuotas de (1.5  $\mu$ l) conteniendo aproximadamente 5000 cpm fueron aplicadas en geles de poliacrilamida 8%, urea 7M, los cuales eran de 0.4 mm de espesor. Las muestras fueron sometidas a electroforesis durante 2 a 4 h a 70 W.

La resolución de los productos de cADN fue controlada aplicando las muestras a intervalos de 2 h. Al finalizar la corrida, los geles fueron embebidos en ácido acético al 10% durante 10 min para remover la urea, secados a 80°C por 1 h y expuestos. Los autoradiogramas permitieron la

\* La mención de firmas comerciales o de sus productos se hace con fines de identificación y no implica su endoso por los autores o sus respectivas instituciones.



lectura de aproximadamente 200 nucleótidos comenzando desde el iniciador. Las secuencias fueron determinadas al menos dos veces en reacciones independientes.

Comparando con el método de secuenciación directo de ARN por dideoxi (27), la estrategia usada en este trabajo lleva a resultados más satisfactorios, debido posiblemente al alto grado de estructura secundaria del ARN viral.

## RESULTADOS

### Mapas bidimensionales ARNasa T<sub>1</sub>

La figura 1 muestra los mapas bidimensionales T<sub>1</sub> de las cepas del VFA que son usadas actualmente para la producción de vacunas en distintos países de Sudamérica (Cuadro 1). Una mejor resolución comparada con aquella obtenida anteriormente (2), fue conseguida al introducir las modificaciones descriptas (5).

La actualización de las cepas vacunales incluyó los virus A<sub>81</sub> Arg/87 y C<sub>3</sub> Arg/85, que fueron introducidos en las vacunas de Argentina. Sus mapas T<sub>1</sub> son claramente distinguibles de aquellos de las otras cepas prototipo (Fig. 1) (2).

Los *fingerprints* de varios clones virales obtenidos de las cepas estudiadas mostraron oligonucleótidos variables (1 a 2 diferencias) con respecto de la semilla original no clonada. Se registraron variaciones similares cuando virus con diferente historia de pasaje fueron comparados (resultados no mostrados).

### Secuencia de nucleótidos y secuencia deducida de aminoácidos de parte de la región que codifica para la VP<sub>1</sub>

La secuencia de nucleótidos y la deducida de aminoácidos correspondientes a la mitad carboxiterminal de la VP<sub>1</sub> de las cepas vacunales se presentan en las Figs. 2 y 3, respectivamente. Una comparación con aquellas ya publicadas fue

establecida en todos los casos disponibles. Las secuencias informadas para la cepa C<sub>3</sub> Res/55 (24), así como aquellas para O<sub>1</sub> C/58 y C<sub>3</sub> Ind/71 (8), fueron confirmadas.

En otros casos, se establecieron algunas discrepancias con las determinaciones previamente informadas (Cuadro 2). La comparación de la secuencia de la cepa O<sub>1</sub> Cas/67 con aquella publicada (25), muestra una mutación silenciosa en el codón 139 y otra que altera la secuencia de aminoácidos de serina a treonina en el codón 171.

Para las cepas tipo A, la secuencia de nucleótidos de la muestra A<sub>24</sub> Cruz/55 difiere de la determinada por Makoff y cols. (18) en una única posición en el codón 126, que resulta en leucina, en vez de prolina. Weddell y cols. (30) establecieron la misma sustitución de nucleótido en el codón 126, aunque estos autores señalaron una diferencia adicional dentro de este codon, la cual da lugar a serina. Asimismo, ellos tenían tres mutaciones silenciosas, dos en el codón 144 y una en el 191. Solamente una mutación silenciosa fue observada para la cepa A<sub>79</sub> Arg/79 en el codón 118, cuando su secuencia se comparó con la publicada por Weddell y cols. (30). En cambio, tres discrepancias se encontraron con respecto a la descrita por Cheung y cols. (9), una que no altera la secuencia de aminoácidos (codón 157) y dos que resultan en cambios en la secuencia de aminoácidos de isoleucina para leucina y de leucina para valina en los codones 176 y 177, respectivamente.

Para las cepas tipo C, la secuencia obtenida para C<sub>3</sub> Ind/71 coincide exactamente con la publicada por Cheung y cols. (8). Esta secuencia difiere marcadamente de aquella registrada previamente por Makoff y cols. (18) en 25 cambios de bases en toda la región codificante de la VP<sub>1</sub>, que resultan en nueve sustituciones de aminoácidos. Tres cambios de nucleótidos, en los codones 141, 165 y 189 fueron observados, cuando la secuencia del virus C<sub>3</sub> Arg/85 fue comparada con la publicada (24). La correspondiente al codón 141 alteró la secuencia de aminoácidos de alanina para valina.

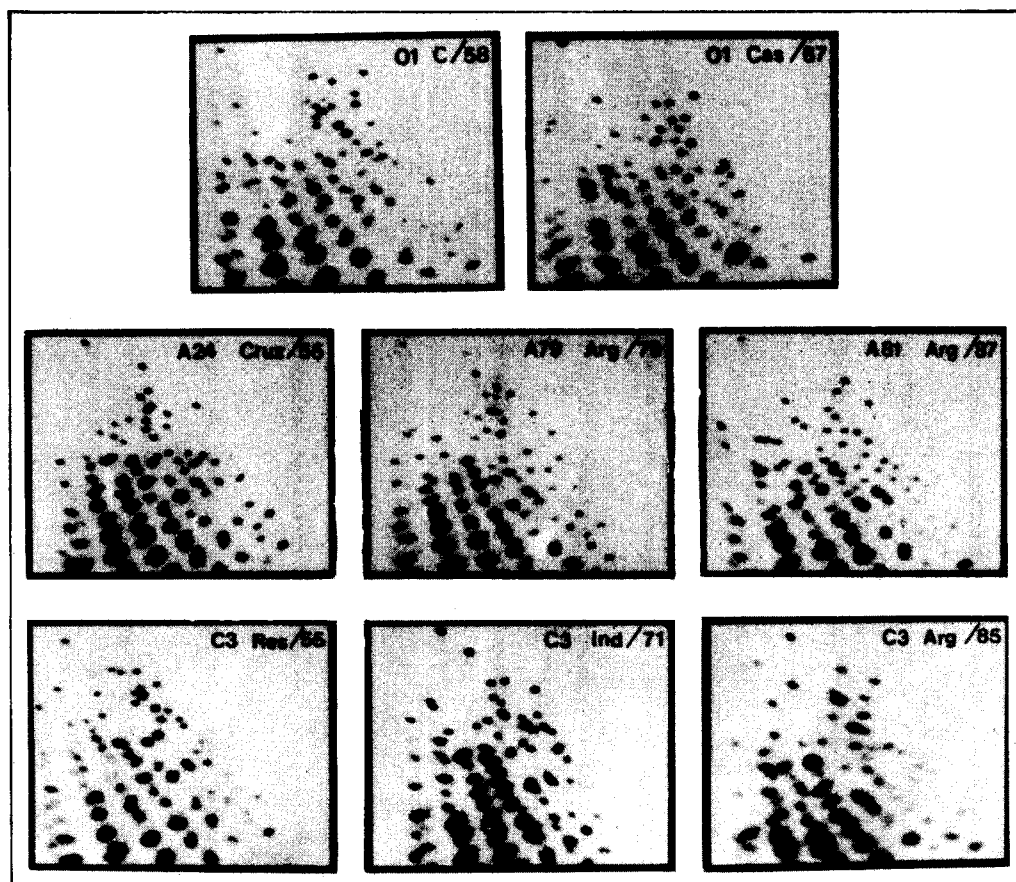


FIGURA 1. Fingerprints de los fragmentos resistentes a ARNasa T<sub>1</sub> del ARN marcado con <sup>32</sup>P de las cepas virales usadas para la producción de vacunas en Sudamérica.

## DISCUSION

Este trabajo describe la caracterización molecular de las cepas de referencia que han sido seleccionadas para ser usadas en la producción y control de vacunas en Sudamérica. Como resultado de una política propuesta que tiende a armonizar las cepas vacunales entre los países, esencialmente las cepas O<sub>1</sub> C/58, A<sub>24</sub> Cruz/55 y C<sub>3</sub> Ind/71, están siendo usadas casi con exclusividad (Cuadro 1).

Los mapas bidimensionales T<sub>1</sub> actualizados de los ARN virales inducidos pertenecientes a las cepas vacunales fueron registrados (Fig. 1). Estos mapas serán usados como una primera aproximación para establecer relaciones genómicas entre virus vacunales y de campo. Considerando la variabilidad del VFA, la homología entre éstos puede ser considerada como un indicio de que el virus aislado en el campo no ha circulado por tiempos prolongados, y que ha sido recientemente reintroducido (4, 16).





**CUADRO 2. Diferencia de nucleótidos y aminoácidos entre las secuencias descriptas en este trabajo y aquellas publicadas previamente.**

Cepa Viral	Referencia	Diferencias en nucleótidos (aminoácidos)		
		posición*	Codón	
			en este trabajo	en referencia
O <sub>1</sub> Cas/67	Rieder Rojas et al, 1992	417 (139)	AAG (K)	AAA (K)
		512 (171)	ACT (T)	AGT (S)
A <sub>24</sub> Cruz/55	Makoff et al, 1982	377 (126)	CTG (L)	CCG (P)
A <sub>24</sub> Cruz/55	Weddell et al, 1985	376,377 (126)	CTG (L)	TCG (S)
		430,432 (144)	AGA (R)	CGT (R)
		571 (191)	TTG (L)	CTG (L)
A <sub>79</sub> Arg/79	Cheung et al, 1984	471 (157)	CAA (Q)	CAG (Q)
		526 (176)	CTC (L)	ATC (I)
		529 (177)	GTG (V)	CTG (L)
A <sub>79</sub> Arg/79	Weddell et al, 1985	354 (118)	CCT (P)	CCG (P)
C <sub>3</sub> Arg/85	Piccone et al, 1988	422 (141)	GTA (V)	GCA (A)
		495 (165)	GCG (A)	GCA (A)
		567 (189)	GTC (V)	GTT (V)

\* La numeración de nucleótidos y aminoácidos es de acuerdo con las Figuras 2 y 3, respectivamente.

La caracterización molecular fue extendida a la secuencia de nucleótidos de la región que codifica para la VP<sub>1</sub>. Aunque trabajos recientes han sugerido la contribución de otras proteínas capsidales, además de la VP<sub>1</sub>, en la antigenicidad general del VFA, es ampliamente aceptado que existe una correlación entre las distancias genéticas establecidas por secuenciamiento de VP<sub>1</sub> y la clasificación serológica convencional (14, 19).

Si bien el secuenciamiento de nucleótidos ha sido determinado por otros laboratorios para algunas de las cepas presentadas aquí, la mayoría de ellas derivaron de muestras que tenían una diferente historia de pasaje. Como fuera informado (8), esto podría explicar las discrepancias encontradas (Cuadro 2).

Las secuencias presentadas en este trabajo han sido obtenidas a partir de ARN total, sin clonado molecular del mismo. Este hecho también podría explicar las diferencias observadas con secuencias publicadas previamente, ya que la mayoría de éstas fueron determinadas con ARN

clonado y por lo tanto, representan solamente unas pocas moléculas del ARN total de la población (18, 26, 30).

El hecho de que nuestras secuencias coinciden exactamente con aquellas previamente determinadas con material genético clonado a partir de ARN proveniente de la colección de virus del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (8) favorece la posibilidad de que las discrepancias enumeradas en el Cuadro 2, se deban a la propagación del virus en diferentes laboratorios.

El secuenciamiento de la región que codifica para la VP<sub>1</sub> de los aislamientos de VFA con propósitos de diagnóstico se encuentra dificultado principalmente por el tiempo requerido para la preparación de templados adecuados. Los esfuerzos que se han realizado para disminuir este tiempo considerablemente (actualmente una semana), incluyen la determinación directa a partir de lisados, sin previa purificación viral.

El uso de nuevos métodos, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que

puede ser aplicada directamente a fluidos vesiculares de animales infectados con VFA, junto con la disponibilidad de técnicas de secuenciamiento mejoradas, permitirá un diagnóstico rápido de la enfermedad. Asimismo, la amplificación por PCR evita la selección de poblaciones virales en células BHK. Sin embargo, las comparaciones con las cepas vacunales deberían involucrar al menos un pasaje en dicho sistema celular, considerando la historia mínima de pasaje de todas las cepas vacunales.

### REFERENCIAS

1. AARONSON, R.P., YOUNG, J.F., PALESE, P. Oligonucleotide mapping: evaluation of its sensitivity by computer-simulation. *Nucleic Acids Res.* 10: 237, 1982.
2. AUGÉ DE MELLO, P., CASAS OLASCOAGA, R., COSTA GIOMI, M.P., ALONSO FERNANDEZ, A., SCODELLER, E.A., LA TORRE, J.L., BERGMANN, I.E. RNA fingerprinting of South American prototype aphthovirus strains. *Vaccine*, 4 (2): 105-110, 1986.
3. BECK, E., STROHMAIER, K. Subtyping of european foot-and-mouth disease virus strains by nucleotide sequence determination. *J. Virol.*, 61 (5): 1621-1629, 1987.
4. BERGMANN, I.E., TIRABOSCHI, B., MAZZUCA, G., FERNANDEZ, E., MICHAÏLOFF, C.A., SCODELLER, E.A., LA TORRE, J.L. Serological and biochemical analysis of foot-and-mouth disease virus (serotype C<sub>1</sub>) isolated in Argentina between 1981 and 1986. *Vaccine*, 6 (3): 245-252, 1988.
5. BERGMANN, I.E., TIRABOSCHI, B.H., BOLLER, M.A.A., MALIRAT, V., PEREIRA, P.J.V., AUGÉ DE MELLO, P. Development of a more rapid and simple procedure for two-dimensional oligonucleotide analysis of foot-and-mouth disease virus: RNA minifingerprinting. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 55: 39-42, 1989.
6. BITTLE, J.L., HOUGHTEN, R.A., ALEXANDER, H., SHINNICK, T.M., SUTCLIFFE, J.G., LERNER, R.A., ROWLANDS, D.J., BROW, F. Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. *Nature*, 298: 30-33, 1982.
7. CARRILLO, C., DOPAZO, J., MOYA, A., GONZALEZ, M., MARTINEZ, M.A., SAIZ, J.C., SOBRINO, F. Comparison of vaccine strains and the virus causing the 1986 foot-and-mouth disease outbreak in Spain: epizootiological analysis. *Virus Research*, 15: 45-56, 1990.
8. CHEUNG, A., DELAMARTER, J., WEISS, S., KUPPER, H. Comparison of the major antigenic determinants of different serotypes of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.*, 2: 451-459, 1983.
9. CHEUNG, A., WHITEHEAD, P., WEISS, S., KUPPER, H. Nucleotide sequence of the VP<sub>1</sub> gene of the foot-and-mouth disease virus strain A Venceslau. *Gene* 30: 241-245, 1984.
10. CLEWLEY, J.P., BISHOP, D.H.L., KANG, C.Y., COFFIN, J., SCHNITZLEIN, W.M., REICHMANN, M.E., SCHOPE, B.E. Oligonucleotide fingerprints of RNA species obtained from rhabdoviruses belonging to the vesicular stomatitis virus subgroup. *J. Virol.*, 23: 152-166, 1977.
11. 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, 1977.
12. COELEN, R.J., MACKENZIE, J.S. Genetic variation of Murray valley encephalitis virus. *J. gen. Virol.*, 69: 1903-1912, 1988.
13. DOMINGO, E., MATEU, M.G., MARTINEZ, M.A., DOPAZO, J., MOYA, A., SOBRINO, F. Genetic variability and antigenic diversity of foot-and-mouth disease virus. In: KURSTAK, E., MARUSTK, R.G., MURPHY, F.A., VAN REGENMORTEL, M.H.V. (Eds.). *Applied Virology Research*. New York, Plenum, 1990. v. 2, p. 233-266.
14. DOPAZO, J., SOBRINO, F., PALMA, E.L., DOMINGO, E., MOYA, A. VP<sub>1</sub> protein gene of foot-and-mouth disease virus: a quasi species model of molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 6811-6815, 1988.
15. DOPAZO, J., SOBRINO, F., DOMINGO, E., MOYA, A. Polymorphism and evolution of the VP<sub>1</sub> protein gene of foot-and-mouth disease virus. In: H.H. Bock (Ed.), *Classification and Related Methods of Data Analysis*. Amsterdam, Elsevier, 1988, p. 349-354.
16. KING, A.M.Q., UNDERWOOD, B.O., MCCAHERN, D., NEWMAN, J.W., BROWN, F. Biochemical identification of viruses causing the 1981 outbreak of foot-and-mouth disease in UK. *Nature*, 293: 479-480, 1981.

17. LA TORRE, J.L., 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 (1): 142-147, 1982.
18. MAKOFF, A.J., PAINTER, C.A., ROWLANDS, D.J., BOOTHROYD, J.C. Comparison of the amino acid sequence of the major immunogen from three serotypes of foot-and-mouth disease virus. *Nucleic Acids Res.*, 10: 8285-8295, 1982.
19. MARTINEZ, M.A., DOPAZO, J., HERNANDEZ, J., MATEU, M.G., SOBRINO, F., DOMINGO, E., KNOWLES, N.J. Evolution of the capsid protein genes of foot-and-mouth disease virus: antigenic variation without accumulation of amino acid substitutions over six decades. *J. Virol.*, 66 (6): 3557-3565, 1992.
20. MATEU, M.G., MARTÍNEZ, M.A., CAPUCCI, L., ANDREU, D., GIRALT, E., SOBRINO, F. *et al.* A single amino acid substitution affects multiple overlapping epitopes in the major antigenic site of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *J. gen. Virol.*, 71 (3): 629-637, 1990.
21. MAXAM, A.M., GILBERT, W. Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Meth. Enzymol.*, 65: 499-560, 1980.
22. PARRY, N.R., BARNETT, P.V., OULDRIDGE, E.J., ROWLANDS, D.J. BROWN, F. Neutralizing epitopes of type O foot-and-mouth disease virus. II. Mapping three conformational sites with synthetic peptide reagents. *J. Gen. Virol.* 70: 1493-1503, 1989.
23. PFAFF, E., MUSSGAY, M., BÖHM, H.O., SCHULZ, G.E., SCHALLER, H. Antibodies against a preselected peptide recognize and neutralize foot-and-mouth disease virus. *EMBO J.*, 1: 869-874, 1982.
24. PICCONE, M.E., KAPLAN, G., GIAVEDONI, L., DOMINGO, E., PALMA, E.L. VP<sub>1</sub> of serotype C foot-and-mouth disease viruses: long-term conservation of sequences. *J. Virol.*, 62 (4): 1469-1473, 1988.
25. RIEDER ROJAS, E., CARRILLO, E., SCHIAPPACASSI, M., CAMPOS, R. Modification of foot-and-mouth disease virus O<sub>1</sub> Caseros after serial passages in the presence of antiviral polyclonal sera. *J. Virol.*, 66 (6): 3368-3372, 1992.
26. ROWLANDS, D.J., CLARKE, D.E., CARROLL, A.R., BROWN, F., NICHOLSON, B.H., BITTIE, J.L., HOUGHTEN, R.A., LERNER, R.A. Chemical basis of antigen variation in foot-and-mouth disease virus. *Nature*, 306: 694-697, 1983.
27. SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 5463-5467, 1977.
28. STROHMAIER, K., FRANZE, R., ADAM, K.H. Location and characterization of the antigenic portion of the FMDV immunizing protein. *J. gen. Virol.*, 59 (2): 295-306, 1982.
29. 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.
30. WEDDELL, G.N., YANSURA, D.G., DOWBENKO, D.J., HOATLIN, M.E., GRUABMAN, M.J., MOORE, D.M., KLEID, D.G. Sequence variation in the gene for the immunogenic capsid protein VP1 of foot-and-mouth disease virus type A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 2618-2622, 1985.
31. XIE, O.C., MCCAHERN, D., CROWTHER, J.R., BELSHAM, G.L., MCCULLOUGH, K.C. Neutralization of foot-and-mouth disease virus can be mediated through any of at least three separate antigenic sites. *J. gen. Virol.*, 68 (6): 1637-1647, 1987.

## MOLECULAR CHARACTERIZATION OF FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS STRAINS USED FOR VACCINE PRODUCTION IN SOUTH AMERICA

I.E. BERGMANN, V.MALIRAT, P.J.V. PEREIRA

Pan-American Foot-and-Mouth Disease Center (PAHO/WHO)  
P.O. Box 589, 20001-970 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

**Abstract.** Foot-and-mouth disease virus strains currently used for vaccine production in South America were characterized by RNase T<sub>1</sub> two-dimensional mapping *fingerprinting*, and by direct cDNA nucleotide sequencing of the carboxyterminal half of the VP<sub>1</sub>-coding region (about 290 nucleotides). Sequences obtained were compared with those previously determined by other laboratories for some of the strains. The results presented constitute the basis for a data bank to assess the degree of similarity between field and vaccine viruses and to monitor the genetic stability of strains during vaccine production and control.

As with a number of other RNA viruses an important characteristic of foot-and-mouth disease virus (FMDV) is its considerable genetic variability (13), responsible for the complex serology of this virus. FMDV exists in seven immunologically different types O, A, C, SAT-1, SAT-2, SAT-3 and Asia-1, each of which can be subdivided into an increasing number of subtypes.

The progress of eradication programs for foot-and-mouth disease in South American countries emphasizes the need for control strategies, which include the tracing of possible origins of infectious virus, in order to identify and eliminate putative sources of the disease. Therefore, diagnostic methods should be established which not only discriminate among serotypes and subtypes, but also among different variants of a given subtype.

In contrast to serological assays, molecular methods provide valuable tools to establish unambiguous relationships among strains. When closely

related viral RNA strains are compared, two-dimensional RNase T<sub>1</sub> mapping constitutes an adequate method (10, 11, 12, 29). In fact, it has been applied to assess the genomic similarities between field and vaccine strains. In contrast to the situation in South America (4), close relationships between most European field and vaccine strains were pointed out (7, 16).

Furthermore, information on how the genomic differences are reflected in the antigenic domains can be provided by nucleotide sequence determination of capsid protein VP<sub>1</sub>. Major immunogenic sites have been recognized in the region around amino acids 138-158 and in the carboxy-terminal end of this protein (6, 20, 22, 23, 28, 31).

In agreement with the results obtained by T<sub>1</sub> mapping, nucleotide sequencing of the VP<sub>1</sub>-coding region revealed that most of the European outbreak viruses were closely related to vaccine strains (3, 7).

In contrast to fingerprinting analysis (1), nucleotide sequencing allows comparisons among distant genomes. In fact, phylogenetic trees relating viruses of serotypes O, A, and C may be constructed, based on nucleotide sequences of the VP<sub>1</sub> gene (14, 15, 19).

---

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



This work records the nucleotide and deduced amino acid sequences of the carboxyterminal half of the VP<sub>1</sub>-coding region of the South American strains currently used for vaccine production. Additionally, updated T<sub>1</sub> maps of the mentioned strains are presented.

## MATERIALS AND METHODS

### Cells, viruses and infections

Viral strains were obtained from the Pan American Foot-and-Mouth Disease Center collection and were passaged two to three times without serum in baby hamster kidney (BHK-21, clone 13) cell monolayer cultures.

Table 1 summarizes the strains of serotypes O, A and C currently used for vaccine production in the different countries of South America, including the number of doses produced and applied in each country.

### RNA isolation and RNase T<sub>1</sub> fingerprinting

<sup>32</sup>P labeling of FMDV RNA and extraction of cytoplasmic RNA were essentially as reported before (2). The method of separation of T<sub>1</sub> oligonucleotides used was a modification of earlier techniques and was performed as described (5, 17).

### Sequence analysis of the VP<sub>1</sub>-coding region

FMDV was purified by pelleting through a sucrose cushion. The virus suspension, adjusted to 2% with sodium dodecylsulfate, was extracted twice with an equal volume of neutralized 80% (wt/wt) phenol-chloroform-isoamyl alcohol (50:49:1). The RNA was precipitated by the addition of two volumes of ethanol.

Alternatively, one 175 cm<sup>2</sup> plastic flask containing a confluent monolayer of BHK-21 cells was inoculated with 10 PFU/cell and incubated until

TABLE 1. Strains used for FMDV vaccine production in South America.

Country	Strain			Vaccine Production in 1992 (doses x 1000)	N° of total doses applied in 1992 (doses x 1000)
	O	A	C		
Argentina	O <sub>1</sub> Cas/67 O <sub>1</sub> C/58	A <sub>79</sub> Arg/79 A <sub>81</sub> Arg/87	C <sub>3</sub> Arg/85	110,094.8	115,690.5
Brazil	O <sub>1</sub> C/58	A <sub>24</sub> Cruz/55	C <sub>3</sub> Ind/71	181,393.6	159,060.8
Colombia	O <sub>1</sub> C/58	A <sub>24</sub> Cruz/55	-	13,390.7	15,116.4
Ecuador	O <sub>1</sub> C/58	A <sub>24</sub> Cruz/55	-	31.0	685.0
Paraguay	O <sub>1</sub> C/58	A <sub>24</sub> Cruz/55	C <sub>3</sub> Res/55	9,998.0	6,652.3
Perú	O <sub>1</sub> C/58	A <sub>24</sub> Cruz/55	C <sub>3</sub> Res/55	500.0	606.0
Uruguay	O <sub>1</sub> C/58	A <sub>24</sub> Cruz/55	C <sub>3</sub> Ind/71	20,341.5	13,528.6
Venezuela	O <sub>1</sub> C/58	A <sub>24</sub> Cruz/55	-	5,629.7	9,722.8

Source: Pan American Foot-and-Mouth Disease Center. Situation of the foot-and-mouth disease control programs. South America, 1992. Rio de Janeiro, PANAFTOSA, 1993. Table 4.

#### Abbreviations:

O<sub>1</sub> Cas/67, O<sub>1</sub> Caseros Arg2/67; O<sub>1</sub> C/58, O<sub>1</sub> Campos Br1/58; A<sub>79</sub> Arg/79, A-79 Argentina/79; A<sub>81</sub> Arg/87, A-81 Castellanos Arg/87; A<sub>24</sub> Cruz/55, A<sub>24</sub> Cruzeiro Br1/55; C<sub>3</sub> Arg/85, C<sub>3</sub> Argentina/85; C<sub>3</sub> Ind/71, C<sub>3</sub> Indaial Br1/71; C<sub>3</sub> Res/55, C<sub>3</sub> Resende Br/55.

most of the cells showed cytopathic effect (usually between 5 and 7 hours after infection). A cytoplasmic extract was made by adding to the cell sheet 10 ml of NET (100 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 7.5, 1 mM EDTA) containing 0.05% Triton X-100. After 5 min at 4°C, nuclei and other cell debris were removed by centrifugation at 2000 rpm, 10 min. The RNA was extracted and purified as described above.

Oligonucleotides were selected complementary to sequences most conserved among different serotypes at distances of 200 to 300 nucleotides on the viral genome. For serotypes O and A primers used were complementary to positions 478 to 500 of the VP<sub>1</sub>-coding region, and to positions 34 to 54 of the 2A gene. Although these oligonucleotides are complementary to the sequence of the O<sub>1</sub>C/58 virus and do not fit in all positions to the corresponding sequence in the A strains, cDNA synthesis worked well with both serotypes. For serotype C, the primer used on the 2A gene was the same as for serotypes O and A. The one complementary to the VP<sub>1</sub>-coding region corresponded to positions 471 to 491.

Oligonucleotides were end labeled with polynucleotide kinase and [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (3000 mCi/ $\mu$ mol) (New England Nuclear Corp. \*) as described previously (21). For cDNA synthesis, samples (3 pmol) of labeled oligonucleotide were incubated with approximately 10  $\mu$ g of partially purified RNA (or with 100  $\mu$ g of total RNA of FMDV-infected cells) in 50  $\mu$ l of 50 mM Tris/HCl, pH 8.3, 60 mM KCl, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM each of the four deoxynucleotide triphosphate, 10 mM dithiothreitol and 10 U of avian myoblastosis virus reverse transcriptase (Promega Biotec. \*). cDNA synthesis was allowed to proceed for 20 min at 42°C. The reaction was stopped by the addition of 2  $\mu$ g/ $\mu$ l of RNase A (DNase free) and incubated for another 15 min. cDNA was then size-selected on 1% agarose gels, so that only those molecules longer than approximately 800 nucleotides were used for sequencing.

The nucleotide sequences were determined by the chemical method of Maxam and Gilbert (21). Samples were resuspended in 80% formamide,

1 mM EDTA, 10 mM NaOH and 0.12% of bromophenol blue.

Aliquots (1.5  $\mu$ l) containing approximately 5000 cpm were loaded onto 8% polyacrylamide 7M urea gels, which were 0.4 mm thick. Samples were electrophoresed for 2 to 4 h at 70 W.

Resolution of cDNA products was controlled by applying the samples at 2 h intervals. After the run, gels were soaked for 10 min in 10% acetic acid to remove urea, dried at 80°C for 1 h, and exposed. Autoradiograms allowed the reading of approximately 200 nucleotides beginning from the primer. Sequences were determined at least twice by independent reactions.

Compared to the direct RNA dideoxy sequencing method (27), the strategy used in this work leads to more satisfactory results, presumably due to the high degree of secondary structure of the viral RNA.

## RESULTS

### Two-dimensional RNase T<sub>1</sub> maps

Figure 1 shows the two-dimensional T<sub>1</sub> maps of FMDV strains which are used at present for vaccine production in different countries of South America (Table 1). Improved resolution compared to that shown previously (2) was attained by introducing the modifications described (5).

The updating of the vaccine strains included viruses A<sub>81</sub>, Arg/87 and C<sub>3</sub>, Arg/85, which were introduced in vaccines from Argentina. Their T<sub>1</sub> maps are clearly distinguishable from those of the other prototype strains, (Fig. 1) (2).

Fingerprints from several viral clones obtained from the strains studied showed variant oligonucleotides (one to two spot differences) with respect to the original uncloned seed. Similar variations were noted when viruses with different passage history were compared (data not shown).

### Nucleotide and deduced amino acid sequences of part of the VP<sub>1</sub>-coding region

The nucleotide and deduced amino acid sequences corresponding to the carboxyterminal half of VP<sub>1</sub> of vaccine strains are presented in Figs. 2 and 3, respectively. A comparison with those already

\* Mention of commercial firms or their products is for identification only and does not imply endorsement by the authors or their institutions.

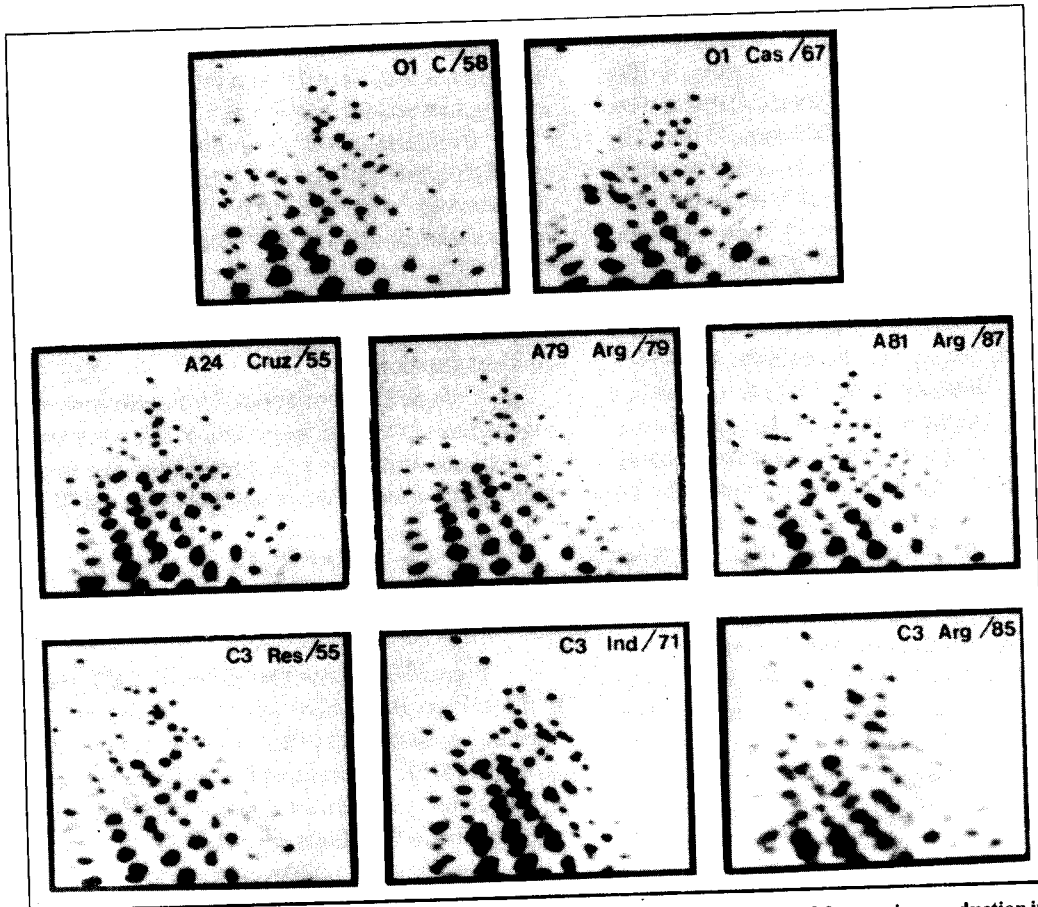


Figure 1. RNase T<sub>1</sub> two-dimensional fingerprints of <sup>32</sup>P-labeled RNA of viral strains used for vaccine production in South America.

published was established in all available cases. The sequences reported for strain C<sub>3</sub> Res/55 (24), as well as those for O<sub>1</sub> C/58, and C<sub>3</sub> Ind/71 (8), were thus confirmed.

In other cases, some discrepancies with the previously reported determinations were established (Table 2). Comparison of the sequence of the strain O<sub>1</sub> Cas/67 with that published (25), shows a silent mutation at codon 139, and another one which alters the amino acid sequence from serine to threonine at codon 171.

For A strains, the nucleotide sequence for sample A<sub>24</sub> Cruz/55 diverges from that determined by Makoff et al. (18), in only one position at codon 126, which leads to leucine instead of proline. Weddell et al. (30) reported the same nucleotide substitution at codon 126, although these authors pointed out an additional mutation within this codon which led to serine. Furthermore, they informed three silent mutations, two at codon 144 and one at 191. Only one silent mutation was observed for the A<sub>79</sub> Arg/79 strain at codon 118, when its sequence was compared to that published by Weddell



01 C/58	120 * PYT	* APHRVLATVY	* NGECRYSRMA	* VPVIRGDLQV	* LAQKVARTLP	* TSFNYGAIKA	* TRVTELLYRM	* KRAETCYCPRP	* LLAIHPTEAR	* HKGKIIVAPVK	* QTL
01 Cas/67			K SK	N E A					D		
A24 Cruz/55	120 * PYT	* APHRVLATVY	* NGTSKYAVGG	* SGRRGDMGSL	* AARVVKQLPA	* SFNYGAIKAD	* AIHELLELYRMK	* RAELCYCPRPL	* LATEVSSQDR	* HKGKIIVAPVK	* QLL
A79 Arg/79			T	A	T				V		
A81 Arg/87			N T S N	L P A A		N R					S
C3 Ind/71	120 * LPY	* TAPHRVLATA	* YTGTTAYTTIG	* VRRGDLAHLA	* AAHARHLPTS	* FNEGAVKAET	* ITELLVVRMKR	* AELCYCPRPVL	* PVQIPAGDRHK	* QPLIAPAKQL	* L
C3 Arg/85		T	SA						S Y		
C3 Res/55		T	T S A	T		V		I I T			S

FIGURE 3. Amino acid sequences deduced from the nucleotide sequences of Figure 2. Amino acids are given in the one-letter code for VP<sub>1</sub> of FMDV 0<sub>1</sub> C/58, A<sub>24</sub> Cruz/55 and C<sub>3</sub> Ind/71. Only sequence deviations are indicated.

TABLE 2. Nucleotide and amino acid differences between the sequence described here and those previously published.

Virus Strain	Reference	Nucleotide (amino acid) differences		
		position*	Codon	
			as in this work	as in reference
O <sub>1</sub> Cas/67	Rieder Rojas et al, 1992	417 (139)	AAG (K)	AAA (K)
		512 (171)	ACT (T)	AGT (S)
A <sub>24</sub> Cruz/55	Makoff et al, 1982	377 (126)	CTG (L)	CCG (P)
A <sub>24</sub> Cruz/55	Weddell et al, 1985	376,377 (126)	CTG (L)	TCG (S)
		430,432 (144)	AGA (R)	CGT (R)
		571 (191)	TTG (L)	CTG (L)
A <sub>79</sub> Arg/79	Cheung et al, 1984	471 (157)	CAA (Q)	CAG (Q)
		526 (176)	CTC (L)	ATC (I)
		529 (177)	GTG (V)	CTG (L)
A <sub>79</sub> Arg/79	Weddell et al, 1985	354 (118)	CCT (P)	CCG (P)
C <sub>3</sub> Arg/85	Piccone et al, 1988	422 (141)	GTA (V)	GCA (A)
		495 (165)	GCG (A)	GCA (A)
		567 (189)	GTC (V)	GTT (V)

\* Nucleotide and amino acid number according to Figs. 2 and 3, respectively.

et al. (30). Instead, three discrepancies were found with respect to that reported by Cheung et al. (9), one which does not alter the amino acid sequence (codon 157) and two which change the amino acid sequence from isoleucine to leucine and from leucine to valine at codons 176 and 177, respectively.

For C strains, the sequence obtained for C<sub>3</sub> Ind/71 agrees exactly with that determined by Cheung et al. (8). This sequence differs markedly from that previously reported by Makoff et al. (18), in 25 base changes in the whole VP<sub>1</sub>-coding region, which result in nine amino acid substitutions. Three nucleotide exchanges at codons 141, 165 and 189 were observed when the sequence from virus C<sub>3</sub> Arg/85 was compared with that published (24). The one at codon 141 altered the amino acid sequence from alanine to valine.

## DISCUSSION

This paper outlines the molecular characterization of reference strains that have been selected for use in vaccine production and control in South

America. As a result of a proposed policy to harmonize vaccine strains among the countries, essentially strains O<sub>1</sub> C/58, A<sub>24</sub> Cruz/55 and C<sub>3</sub> Ind/71 are almost exclusively used (Table 1).

Updated two-dimensional T<sub>1</sub> maps of viral induced RNAs of vaccine strains were recorded (Fig. 1). These maps will be used as a first approximation to establish genomic relationships between field and vaccine viruses. Considering the variability of FMDV, the homology between them can be taken as an indication that the virus isolated in the field had not circulated for a long time, and that it had been recently re-introduced (4, 16).

Molecular characterization was extended to the nucleotide sequencing of the VP<sub>1</sub>-coding region. Even though recent work has suggested the contribution of capsid proteins other than VP<sub>1</sub> to the overall antigenicity of FMDV, it is widely accepted that there is a correlation between genetic distances assessed by VP<sub>1</sub> sequencing, and the conventional serological classification (14, 19).

Although nucleotide sequencing has been determined by other laboratories for some of the

strains presented herein, most of them were derived from samples which had a different passage history. As reported (8), this could explain the discrepancies found (Table 2).

The sequences presented in this work were obtained from total RNA without molecular cloning. This fact could also account for the differences observed with previously published sequences, as most of them were determined with cloned RNA, and therefore may represent only a few RNA molecules from the overall population (18, 26, 30).

The fact that our sequences agree exactly with those previously determined with cloned genetic material derived from RNA which was obtained from the Pan-American Foot-and-Mouth Disease Center virus collection (8) favours the possibility that the discrepancies listed in Table 2 may have been due to propagation of the viruses in different laboratories.

Sequencing of the VP<sub>1</sub>-coding region of FMDV isolates for diagnostic purposes is hindered mainly by the time required for preparation of suitable templates. Efforts to shorten this time considerably (presently one week) include determinations directly from lysates without virus purification.

The use of new methods, such as the polymerase chain reaction (PCR), that can be directly applied to vesicular fluids of FMDV-infected animals, together with the availability of improved sequencing techniques, will allow a quick diagnosis of the disease. Furthermore, amplification by PCR avoids selection of viral populations in BHK cells. However, comparisons with vaccine strains should involve at least one passage in this cell system, bearing in mind the minimum passage history of all vaccine strains.

## REFERENCES

1. AARONSON, R.P., YOUNG, J.F., PALESE, P. Oligonucleotide mapping: evaluation of its sensitivity by computer-simulation. *Nucleic Acids Res.* 10: 237, 1982.
2. AUGÉ DE MELLO, P., CASAS OLASCOAGA, R., COSTA GIOMI, M.P., ALONSO FERNANDEZ, A., SCODELLER, E.A., LA TORRE, J.L., BERGMANN, I.E. RNA fingerprinting of South American prototype aphthovirus strains. *Vaccine*, 4 (2): 105-110, 1986.
3. BECK, E., STROHMAIER, K. Subtyping of european foot-and-mouth disease virus strains by nucleotide sequence determination. *J. Virol.*, 61 (5): 1621-1629, 1987.
4. BERGMANN, I.E., TRABOSCHI, B., MAZZUCA, G., FERNANDEZ, E., MICHAÏLOFF, C.A., SCODELLER, E.A., LA TORRE, J.L. Serological and biochemical analysis of foot-and-mouth disease virus (serotype C<sub>3</sub>) isolated in Argentina between 1981 and 1986. *Vaccine*, 6 (3): 245-252, 1988.
5. BERGMANN, I.E., TRABOSCHI, B.H., BOLLER, M.A.A., MALIRAT, V., PEREIRA, P.J.V., AUGÉ DE MELLO, P. Development of a more rapid and simple procedure for two-dimensional oligonucleotide analysis of foot-and-mouth disease virus: RNA minifingerprinting. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 55: 39-42, 1989.
6. BITTLE, J.L., HOUGHTEN, R.A., ALEXANDER, H., SHINNICK, T.M., SUTCLIFFE, J.G., LERNER, R.A., ROWLANDS, D.J., BROW, F. Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. *Nature*, 298: 30-33, 1982.
7. CARRILLO, C., DOPAZO, J., MOYA, A., GONZALEZ, M., MARTINEZ, M.A., SAIZ, J.C., SOBRINO, F. Comparison of vaccine strains and the virus causing the 1986 foot-and-mouth disease outbreak in Spain: epizootiological analysis. *Virus Research*, 15: 45-56, 1990.
8. CHEUNG, A., DELAMARTER, J., WEISS, S., KUPPER, H. Comparison of the major antigenic determinants of different serotypes of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.*, 2: 451-459, 1983.
9. CHEUNG, A., WHITEHEAD, P., WEISS, S., KUPPER, H. Nucleotide sequence of the VP<sub>1</sub> gene of the foot-and-mouth disease virus strain A Venceslau. *Gene* 30: 241-245, 1984.
10. CLEWLEY, J.P., BISHOP, D.H.L., KANG, C.Y., COFFIN, J., SCHNITZLEIN, W.M., REICHMANN, M.E., SCHÖPE, B.E. Oligonucleotide fingerprints of RNA species obtained from rhabdoviruses belonging to the vesicular stomatitis virus subgroup. *J. Virol.*, 23: 152-166, 1977.
11. 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, 1977.

12. COELEN, R.J., MACKENZIE, J.S. Genetic variation of Murray valley encephalitis virus. *J. gen. Virol.*, 69: 1903-1912, 1988.
13. DOMINGO, E., MATEU, M.G., MARTINEZ, M.A., DOPAZO, J., MOYA, A., SOBRINO, F. Genetic variability and antigenic diversity of foot-and-mouth disease virus. In: KURSTAK, E., MARUSTK, R.G., MURPHY, F.A., VAN REGENMORTEL, M.H.V. (Eds.). *Applied Virology Research*. New York, Plenum, 1990. v. 2, p. 233-266.
14. DOPAZO, J., SOBRINO, F., PALMA, E.L., DOMINGO, E., MOYA, A. VP<sub>1</sub> protein gene of foot-and-mouth disease virus: a quasispecies model of molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 6811-6815, 1988.
15. DOPAZO, J., SOBARINO, F., DOMINGO, E., MOYA, A. Polymorphism and evolution of the VP1 protein gene of foot-and-mouth disease virus. In: H.H. Bock (Ed.), *Classification and Related Methods of Data Analysis*. Amsterdam, Elsevier, 1988, p. 349-354.
16. KING, A.M.Q., UNDERWOOD, B.O., MCCAHERN, D., NEWMAN, J.W., BROWN, F. Biochemical identification of viruses causing the 1981 outbreak of foot-and-mouth disease in UK. *Nature*, 293: 479-480, 1981.
17. LA TORRE, J.L., 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 (1): 142-147, 1982.
18. MAKOFF, A.J., PAINTER, C.A., ROWLANDS, D.J., BOOTHROYD, J.C. Comparison of the amino acid sequence of the major immunogen from three serotypes of foot-and-mouth disease virus. *Nucleic Acids Res.*, 10: 8285-8295, 1982.
19. MARTINEZ, M.A., DOPAZO, J., HERNANDEZ, J., MATEU, M.G., SOBRINO, F., DOMINGO, E., KNOWLES, N.J. Evolution of the capsid protein genes of foot-and-mouth disease virus: antigenic variation without accumulation of amino acid substitutions over six decades. *J. Virol.*, 66 (6): 3557-3565, 1992.
20. MATEU, M.G., MARTÍNEZ, M.A., CAPUCCI, L., ANDREU, D., GIRALT, E., SOBRINO, F. *et al.* A single amino acid substitution affects multiple overlapping epitopes in the major antigenic site of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *J. gen. Virol.*, 71 (3): 629-637, 1990.
21. MAXAM, A.M., GILBERT, W. Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Meth. Enzymol.*, 65: 499-560, 1980.
22. PARRY, N.R., BARNETT, P.V., OULDRIDGE, E.J., ROWLANDS, D.J. BROWN, F. Neutralizing epitopes of type O foot-and-mouth disease virus. II. Mapping three conformational sites with synthetic peptide reagents. *J. Gen. Virol.* 70: 1493-1503, 1989.
23. PFAFF, E., MUSSGAY, M., BÖHM, H.O., SCHULZ, G.E., SCHALLER, H. Antibodies against a preselected peptide recognize and neutralize foot-and-mouth disease virus. *EMBO J.*, 1: 869-874, 1982.
24. PICCONE, M.E., KAPLAN, G., GIAVEDONI, L., DOMINGO, E., PALMA, E.L. VP<sub>1</sub> of serotype C foot-and-mouth disease viruses: long-term conservation of sequences. *J. Virol.*, 62 (4): 1469-1473, 1988.
25. RIEDER ROJAS, E., CARRILLO, E., SCHIAPPACASSI, M., CAMPOS, R. Modification of foot-and-mouth disease virus O<sub>1</sub> Caseros after serial passages in the presence of antiviral polyclonal sera. *J. Virol.*, 66 (6): 3368-3372, 1992.
26. ROWLANDS, D.J., CLARKE, D.E., CARROLL, A.R., BROWN, F., NICHOLSON, B.H., BITTIE, J.L., HOUGHTEN, R.A., LERNER, R.A. Chemical basis of antigen variation in foot-and-mouth disease virus. *Nature*, 306: 694-697, 1983.
27. SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 5463-5467, 1977.
28. STROHMAIER, K., FRANZE, R., ADAM, K.H. Location and characterization of the antigenic portion of the FMDV immunizing protein. *J. gen. Virol.*, 59 (2): 295-306, 1982.
29. 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.
30. WEDDELL, G.N., YANSURA, D.G., DOWBENKO, D.J., HOATLIN, M.E., GRUABMAN, M.J., MOORE, D.M., KLEID, D.G. Sequence variation in the gene for the immunogenic capsid protein VP1 of foot-and-mouth disease virus type A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 2618-2622, 1985.
31. XIE, O.C., MCCAHERN, D., CROWTHER, J.R., BELSHAM, G.L., MCCULLOUGH, K.C. Neutralization of foot-and-mouth disease virus can be mediated through any of at least three separate antigenic sites. *J. gen. Virol.*, 68 (6): 1637-1647, 1987.



## Resúmenes

### Abstracts

AMADORI, M., LODETTI, E., MASSIRIO, I., PANINA, G. F.

Texto en italiano. *Selezione Veterinaria*, 32(12): 1773-1780, 1991. Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia, Via A. Bianchi 7, 25125 Brescia, Italia.

***Erradicación de la fiebre aftosa en Italia: análisis de costo-beneficio de un cambio de estrategia.***

La vacunación contra la fiebre aftosa se suspendió en Italia desde agosto de 1991, de acuerdo con la directiva EC 90/423. Un análisis de simulación de dos estrategias (vacunación y no vacunación) en el peor escenario (brotes primarios repetidos en áreas de alta densidad de ganado del valle del Pó) mostró que, en un período de 10 años, el costo de la política de no vacunación fue efectivo para más de 3-4 brotes de moderada severidad.

***Eradication of foot and mouth disease in Italy: cost benefit analysis of a change in strategy.***

Vaccination against foot and mouth disease has ceased in Italy since August, 1991, in accordance with the EC directive 90/423. A simulation analysis of 2 strategies (vaccination and non-vaccination) in the worst scenario (repeated primary outbreaks in high-density livestock areas in the Po Valley) showed that the nonvaccination policy was cost effective for up to 3-4 outbreaks of moderate severity in a 10-year period.

CAO, X., BERGMANN, I. E., BECK, E.

Texto en inglés. *J. Gen. Virol.*, 72 (11): 2821-2825, 1991. Zentrum für Molekulare Biologie Heidelberg (ZMBH), D-6900 Heidelberg, Germany.

***Comparación de las regiones genómicas 5' y 3' no traducidas de aftovirus virulentos y atenuados (cepas O<sub>1</sub> Campos y C<sub>3</sub> Resende).***

Las regiones completas no codificantes 5' y 3' de dos cepas vacunales atenuadas de aftovirus de América del Sur, O<sub>1</sub>C-O/E y C<sub>3</sub>R-O/E, y sus correspondientes cepas virulentas, O<sub>1</sub> Campos y C<sub>3</sub> Resende, fueron clonadas de ADNc amplificado por reacción en cadena de polimerasa primaria. Diferencias observadas entre virus atenuados y virulentos en las secuencias del nucleótido producido parecen no afectar las estructuras de señales reguladoras, apoyando la teoría de que las variaciones genéticas, principalmente en las mitades 3' del genoma viral, contribuyen a la atenuación fenotípica de las cepas vacunales. Además, este es el

***Comparison of the 5' and 3' untranslated genomic regions of virulent and attenuated foot-and-mouth disease viruses (strains O<sub>1</sub> Campos and C<sub>3</sub> Resende).***

The complete 5' and 3' non-coding regions of two attenuated South American foot-and-mouth disease virus (FMDV) vaccine strains, O<sub>1</sub>C-O/E and C<sub>3</sub>R-O/E, and their corresponding virulent parental strains, O<sub>1</sub> Campos and C<sub>3</sub> Resende, have been cloned from polymerase chain reaction-amplified primary cDNA. Differences observed in the derived nucleotide sequences between attenuated and virulent viruses seem not to affect regulatory signal structures, supporting the theory that genetic variations, primarily in the 3' halves of the viral genomes, contribute to the attenuation phenotype of the vaccine strains. In addition, this

primer informe sobre la secuencia completa de la región 5' no traducida del aftovirus tipo C. Aproximadamente 10% de los nucleótidos difieren de las correspondientes secuencias conocidas de los serotipos A u O.

is the first report on the complete sequence of the 5' untranslated region of a C-type aphthovirus. Approximately 10% of the nucleotides differ from the corresponding known sequences of serotypes A or O.

CROWTHER, J. R., ANGARITA, L., ANDERSON, J.

Texto en inglés. *Biologicals*, 18 (4): 331-336, 1990. In: *Index Vet.*, 62 (5), 1992. Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory, Pirbright, Woking, Surrey, GU24 0NF, UK.

***Evaluación del uso de substratos cromogénicos y fluorogénicos en pruebas ELISA de fase sólida.***

Se usaron substratos fluorogénicos y cromogénicos en pruebas de ELISA directas y de captura para detectar IgG de ratón y aftovirus. Los límites de detección para ambos antígenos se compararon usando diferentes combinaciones de enzimas y substratos. Se usaron varios tiempos y concentraciones de agentes químicos para obtener la máxima sensibilidad con ambos sistemas. Se encontraron sensibilidades similares usando substratos fluorogénicos y cromogénicos. Se encontró que los substratos de tetrametilbenzidina para conjugados enzimáticos de peroxidasa permitían alcanzar los niveles de sensibilidad más elevados para ensayos cromogénicos (0,12 ng IgG/ml y 1,0 ng/ml de aftovirus, respectivamente), tras incubación durante 10 min. De los dos substratos fluorogénicos/enzimáticos estudiados, la B-galactosidasa fue la más sensible pero, cuando fue comparada con los sistemas cromogénicos, se necesitó extender los tiempos de incubación (2-3 h). Para el fluoroinmunoensayo, se compararon microplacas especiales con microplacas convencionales, y no se encontró ninguna ventaja que justificase su uso. Se usó un conjugado de fosfatasa alcalina anticobayo para confirmar la equivalencia de substratos fluorogénicos y cromogénicos en términos de sensibilidad. Se hizo una comparación de la cantidad de señal generada usando varias concentraciones de enzima en la ausencia de antígeno para dos conjugados diferentes de fosfatasa alcalina para obtener límites de sensibilidad teóricos. Una de las posibles ventajas del uso de substratos fluorogénicos es que la elevada tasa de unión puede aumentar la confianza en la discriminación de resultados positivos.

***Evaluation of the use of chromogenic and fluorogenic substrates in solid-phase enzyme linked immunosorbent assays (ELISA).***

Fluorogenic and chromogenic substrates were used in direct and trapping ELISA for the detection of mouse IgG and foot-and-mouth disease virus (FMDV). The detection limits for both antigens were compared using different combinations of enzymes and substrates. Various times and concentrations of chemicals were used to obtain maximum sensitivity for both systems. Similar sensitivities were found using fluorogenic and chromogenic substrates. Tetramethyl benzidine substrates for horse-radish peroxidase enzyme conjugates was found to attain the highest sensitivity levels for chromogenic assays (0.12 ng IgG/ml and 1.0 ng/ml FMDV respectively), after 10 min incubation. Of the 2 fluorogenic enzyme/substrates studied, B-galactosidase was the most sensitive but required extend incubation times (2-3 h) as compared with chromogenic systems. Special microplates for fluoro-immunoassay (FIA) were compared with conventional microplates and no advantage was found to justify their use. An alkaline phosphatase anti-guinea-pig conjugate was used to confirm the equivalence of fluorogenic and chromogenic substrates in terms of sensitivity. A comparison of the amount of signal generated using various concentrations of enzyme in the absence of antigen was made for two different alkaline phosphatase conjugates to obtain theoretical sensitivity limits. One possible advantage of fluorogenic substrates is that high binding ratio can improve the confidence in discrimination of positive results.

GONZALEZ, M., MATEU, M. G., MARTINEZ, M. A., CARRILLO, C., SOBRINO, F.

Texto en inglés. *Vaccine*, 10(11): 731-734, 1992. Departamento de Sanidad Animal, CIT-INIA. C/, Embajadores 68, 28012 Madrid, España.

***Comparación de la cápside de la proteína VP1 de los virus usados para la producción y desafío de vacunas antiaftosa en España.***

Se encontró una frecuencia significativa de sustituciones de aminoácidos que afectan sitios antigénicos importantes en la proteína capsídica VP1 entre preparaciones de virus usadas para la producción, y para desafíos en ensayos de protección de vacunas antiaftosa. Las sustituciones de aminoácidos presentes en uno de los virus estudiados anularon su reactividad con dos anticuerpos monoclonales neutralizantes que reconocieron diferentes epitopes en VP1. Por lo tanto, los resultados obtenidos ilustran el elevado potencial para la variación antigénica introducido por los varios ciclos de crecimiento a que usualmente son sometidas las cepas usadas para la producción y desafío de vacunas antiaftosa.

***Comparison of capsid protein VP1 of the viruses used for the production and challenge of foot-and-mouth disease vaccines in Spain.***

A significant frequency of amino acid substitutions, that affect important antigenic sites on capsid protein VP1, has been found among viral preparations used for the production and for challenge, in protection assays, of foot-and-mouth disease (FMD) vaccines. The amino acid substitutions present in one of the viruses studied abolished its reactivity with two neutralizing monoclonal antibodies that recognized different epitopes on VP1. Thus, the results obtained illustrate the high potential for antigenic variation introduced by the multiple cycles of growth usually undergone by the strains used for the production and challenge of FMD vaccines.

LAOR, O., TORGERSEN, H., YADIN, H., BECKER, Y.

Texto en inglés. *J. Virol. Meth.*, 36 (3): 197-208, 1992. Department of Molecular Virology, Faculty of Medicine, Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem, Israel.

***Detección de ARN de aftovirus amplificado por la reacción en cadena de polimerasa (PCR).***

La detección molecular de aftovirus usando la reacción en cadena de polimerasa (PCR) es un método rápido y preciso. En este estudio se presenta la PCR para la detección de ARN de aftovirus en células BHK infectadas. Usando la PCR y dos "primers" seleccionados del gen de la polimerasa del ARN, una secuencia conservada en todos los tipos y subtipos del aftovirus, se detectó el ARN del aftovirus presente en el ARN extraído de células infectadas. El ARN de células sin infectar dio resultados negativos. Otro conjunto de "primers" seleccionados de la secuencia de nucleótidos del gen variable de VP1 permitió demostrar por PCR variaciones entre diferentes aislados de aftovirus en Israel. Dos aislamientos de aftovirus tipo O1, de un total de seis aislados de campo (incluyendo O1 Geshur), dieron una PCR positiva, mientras que otros dos, así como dos aislamientos de Asia fueron detectados con "primers" del gen de la

***Detection of FMDV RNA amplified by the polymerase chain reaction (PCR).***

Molecular detection of foot-and-mouth disease virus (FMDV) using the polymerase chain reaction (PCR) is a rapid and accurate method. In this study we present PCR for the detection of FMDV RNA in infected BHK cells. Using PCR and two primers selected from the RNA polymerase gene, a conserved sequence in all types and subtypes of FMDV, we were able to detect FMDV RNA present in RNA extracted from the FMDV-infected cells. RNA from uninfected BHK cells gave negative results. Another set of primers selected from the nucleotide sequence of the variable VP1 gene permitted the demonstration of variations among different FMDV Israeli isolates by PCR. Two O1 type FMDV isolates out of a total of 6 FMDV field isolates (including O1 Geshur) gave a positive PCR while two other isolates and two ASIA isolates were detected with the RNA polymerase gene primers but not with the VP1 primers. Serial dilutions of the

polimerasa del ARN, pero no con "primers" VP1. Diluciones en serie del ARN usado en cada reacción mostraron que una pequeña cantidad del ARN se detectó por PCR. Los productos de la PCR a partir de la polimerasa de ARN y los genes de VP1 fueron secuenciados y se compararon las secuencias de nucleótidos obtenidas, con una secuencia conocida de nucleótidos del genoma del aftovirus O1.

RNA used in each reaction showed that a very small amount of RNA may be detected by PCR. The PCR products from the RNA polymerase and the VP1 genes were sequenced and the nucleotide sequences obtained were compared with a known nucleotide sequence of the FMDV O1 genome.

LUBROTH, J., YEDLOUTSCHNIG, R. J., CULHANE, V. K., MIKICIUK, P. E.

Texto en inglés. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2 (3): 197-203, 1990. Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service, Foreign Animal Disease Diagnostic Laboratory, PO Box 848, Greenport, NY 11944, USA.

***Aftovirus en la llama (Lama glama): diagnóstico, transmisión y susceptibilidad.***

Se demostró que el aftovirus se transmite tanto de bovinos a llamas como de llamas a porcinos (interespecies), o de llamas a llamas (intraespecies). La respuesta al aftovirus varió mucho en las seis llamas estudiadas: tres desarrollaron enfermedad clínica generalizada con fiebre moderada; dos, después de inoculación vía intradermolingual; y una, tras exposición a un novillo infectado con el serotipo A24. Otra llama contacto desarrolló lesiones vesiculares en las cuatro patas pero no en la boca. Dos llamas contacto, en grupos separados de estudio, no presentaron seroconversión ni desarrollaron signos clínicos de infección con aftovirus. Las cuatro llamas que mostraron enfermedad clínica desarrollaron anticuerpos virusneutralizantes contra el aftovirus A24 y anticuerpos contra el antígeno VIA. Los títulos de anticuerpos virusneutralizantes permanecieron elevados por más de 200 días después que apareció el anticuerpo virusneutralizante y, en tres de las cuatro llamas clínicamente afectadas, fue más débil a los 100-125 tras exposición al aftovirus. Una llama inoculada aún era VIA positiva a los 360 días posinoculación. El aftovirus A24 no fue detectado en muestras esofágico-faríngeas dentro de los ocho días posexposición usando técnicas *in vitro*.

***Foot-and-mouth disease virus in the llama (Lama glama): diagnosis, transmission, and susceptibility.***

Foot-and-mouth disease virus (FMDV) was shown to be transmitted from either cattle to llamas, llamas to swine (interspecies), or llamas to llamas (intraspecies). Response to FMDV varied greatly in the 6 llamas studied, 3 llamas developed generalized clinical disease with mild pyrexia, 2 after intradermolingual inoculation, and 1 after exposure to a calf infected with FMDV serotype A24. Another contact llama developed vesicular lesions on all 4 extremities but no oral lesions. Two contact llamas, in separate study groups, did not seroconvert or develop clinical signs of FMDV infection. All 4 llamas showing clinical disease developed virus-neutralizing antibodies against FMDV A24 and antibodies against the virus-infection-associated antigen. Virus-neutralizing antibody titers remained elevated for over 200 days after virus-neutralizing antibody appeared and became weaker 100-125 days post-FMDV exposure in 3 of the 4 clinically affected llamas. One inoculated llama was still positive for virus-infection-associated antigen at 360 days after inoculation. Foot-and-mouth disease virus A24 was not detected from esophageal-pharyngeal fluid specimens beyond 8 days postexposure using *in vitro* techniques.

MARTINEZ, M. A., DOPAZO, J., HERNANDEZ, J., MATEU, M. G., SOBRINO, F., DOMINGO, E., KNOWLES, N.J.

Texto en inglés. *J. Virol.*, 66 (6): 3557-3565, 1992. Centro de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28-49 Madrid, España.

***Evolución de genes de las proteínas de cápside de aftovirus: variación antigénica sin acúmulo de sustituciones de aminoácido durante seis décadas.***

Se estudió la diversificación genética del aftovirus serotipo C durante un período de seis décadas, comparando secuencias de nucleótidos de las regiones que codifican para la proteína de la cápside de virus aislados en Europa, América del Sur y Filipinas. Se derivaron árboles filogenéticos para ARNs de VP1 y P1 (VP1, VP2, VP3 y VP4) usando el método de cuadrados mínimos. Intervalos de confianza de la filogenie derivada (niveles de significación de inclinación y desviaciones estándares del largo de las ramas) se colocaron por la aplicación del método "bootstrap" de remuestreo. Estos procedimientos definieron seis linajes evolutivos principales, altamente significativos y una red compleja de sublíneas para los aislamientos de América del Sur. Por el contrario, los aislamientos europeos son considerablemente más homogéneos, probablemente debido al origen vacunal de varios de ellos. El análisis filogenético sugiere que el aftovirus CGC Ger/26 (uno de los primeros aislamientos disponibles) pertenecía a una línea de evolución que en la actualidad está aparentemente extinta. Intentos para determinar la fecha de origen (ancestral) de los aftovirus analizados se enfrentaron con dudas considerables, principalmente debido a la estasis notada en virus europeos. Notablemente, la evolución de los genes de la cápside del aftovirus estuvo asociada esencialmente con el acúmulo lineal de mutaciones silenciosas pero no se observó acúmulo continuo de sustituciones de aminoácidos. Por lo tanto, la variación antigénica lograda por el aftovirus tipo C durante seis décadas se debió a fluctuaciones entre combinaciones limitadas de residuos de aminoácidos sin acúmulo neto de reemplazos de aminoácido a través del tiempo.

***Evolution of the capsid protein genes of foot-and-mouth disease virus: antigenic variation without accumulation of amino acid substitutions over six decades.***

The genetic diversification of foot-and-mouth disease virus (FMDV) of serotype C over a 6-decade period was studied by comparing nucleotide sequences of the capsid protein-coding regions of viruses isolated in Europe, South America, and The Philippines. Phylogenetic trees were derived for VP1 and P1 (VP1, VP2, VP3, and VP4) RNAs by using the least-squares method. Confidence intervals of the derived phylogeny (significance levels of nodes and standard deviations of branch lengths) were placed by application of the bootstrap resampling method. These procedures defined six highly significant major evolutionary lineages and a complex network of sublines for the isolates from South America. In contrast, European isolates are considerably more homogeneous, probably because of the vaccine origin of several of them. The phylogenetic analysis suggests that FMDV CGC Ger/26 (one of the earliest FMDV isolates available) belonged to an evolutionary line which is now apparently extinct. Attempts to date the origin (ancestor) of the FMDVs analyzed met with considerable uncertainty, mainly owing to the stasis noted in European viruses. Remarkably, the evolution of the capsid genes of FMDV was essentially associated with linear accumulation of silent mutations but continuous accumulation of amino acid substitutions was not observed. Thus, the antigenic variation attained by FMDV type C over 6 decades was due to fluctuations among limited combinations of amino acid residues without net accumulation of amino acid replacements over time.

MULCAHY, G., PULLEN, L. A., GALE, C., DIMARCHI, R. D., DOEL, T. R.

Texto en inglés. *Vaccine*, 9 (1): 19-42, 1991. AFRC Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory, Ash Road, Pirbright, Woking, Surrey, UK.

***Prueba de seroprotección como un predictor de la capacidad de protección de vacunas antiaftosa sintéticas.***

Se describe la prueba de inmunidad pasiva (MPT) en ratones lactantes para cuantificar los anticuerpos protectores anti-aftovirus. Comparaciones con los títulos obtenidos usando pruebas de seroneutralización convencionales muestran que para los bovinos vacunados con vacunas de péptido sintético esta prueba *in vivo* es un mejor indicador de protección, mientras que para animales convalecientes y vacunados con virus, ambas pruebas son predictores igualmente válidos del estado inmunitario. El clivaje de fragmentos Fc de antiviruses o antipéptido IgG resulta en una marcada disminución en los títulos de MPT aunque la unión al virus en ELISA no es afectada, indicando que son necesarios anticuerpos intactos para la eliminación de aftovirus *in vivo*. Estudios de protección cruzada demuestran que sueros antipéptido, aunque menos potentes que los sueros antivirales para conferir inmunidad pasiva contra el desafío por aftovirus, tienen una mayor gama protectora que los sueros antivirales dentro del serotipo O y también entre los serotipos O y A. A la luz de estos hallazgos se discuten posibles diferencias cualitativas entre sueros antivirales y antipéptidos.

***Mouse protection test as a predictor of the protective capacity of synthetic foot-and-mouth disease vaccines.***

A passive immunity test (MPT) in suckling mice for the quantification of protective anti-foot-and-mouth disease virus (FMDV) antibodies in serum is described. Comparisons with titres obtained using conventional serum neutralization tests show that for cattle given synthetic peptide vaccines this *in vivo* assay is a better indicator of protection, while for convalescent animals and virus-vaccinates both tests are equally valid predictors of immune status. Cleavage of Fc fragments from anti-virus or anti-peptide IgG results in a marked decrease in MPT titres although binding to virus in ELISA is unaffected, indicating that intact antibodies are required for *in vivo* clearance of FMDV. Cross-protection studies demonstrate that anti-peptide sera, while less potent than anti-viral sera in conferring passive immunity against FMDV challenge, have a wider protective range than anti-viral sera within the O serotype and also between O and A serotypes. Possible qualitative differences between anti-viral and anti-peptide sera are discussed in the light of these findings.

NEITZERT, E., BECK, E., AUGÉ, M. P., GOMES, I., BERGMANN, I. E.

Texto en inglés. *Virology*, 184 (2): 799-804, 1991. Pan American Foot-and-Mouth Disease Center, Caixa Postal 589, 20001-970 Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

***Expresión en Escherichia coli de la polimerasa del ARN del gen del aftovirus y su uso junto con otros antígenos no estructurales preparados por bioingeniería en la detección de infecciones persistentes tardías.***

Se construyó un plásmido conteniendo secuencias de ADN que dirigen la expresión de la ARN polimerasa ARN-dependiente (antígeno asociado a la infección por virus, VIAA) del aftovirus en su forma nativa. El polipéptido del aftovirus fue diseñado para contener solo un único aminoácido adicional, la metionina del terminal N. Se purificó la proteína recombinante y se

***Expression of the aphthovirus RNA polymerase gene in Escherichia coli and its use together with other bioengineered nonstructural antigens in detection of late persistent infections.***

A plasmid has been constructed containing the DNA sequences that direct the expression of the aphthovirus RNA-dependent RNA polymerase (virus infection-associated antigen, VIAA) in its native form. The aphthovirus polypeptide was designed to contain only a single additional amino acid, the N-terminal methionine. The recombinant protein has been puri-

usó en "enzyme-linked immunoelectrotransfer blots" para detectar anticuerpos específicos al aftovirus en los sueros de animales persistentemente infectados. Además, se realizaron estudios para probar la hipótesis de que los anticuerpos contra otros antígenos no estructurales aparecen en los sueros de estos animales. Se estableció que los anticuerpos contra los polipéptidos 3A y 3B sirven como marcadores complementarios para la detección del estado tardío en portadores de aftovirus. Se demostró el considerable potencial de este hallazgo para detectar anticuerpos específicos para aftovirus, cuando el aislamiento de virus infecciosos no es posible. Se obtuvieron resultados negativos en animales de áreas libre de virus y en bovinos vacunados. Este ensayo tiene la ventaja adicional de que no se utiliza virus, infeccioso o no, durante la producción de antígeno.

fied and used in enzyme-linked immunoelectrotransfer blots to detect aphthovirus-specific antibodies in the sera of persistently infected animals. Furthermore, studies were carried out to test the hypothesis that antibodies against other nonstructural antigens appear in the sera of these animals. It was established that antibodies against polypeptides 3A and 3B can serve as complementary markers for late aphthovirus-carrier state detection. The considerable potential of this approach to detect aphthovirus-specific antibodies, when the isolation of infectious virus is not possible, was demonstrated. Negative results were obtained in animals from virus-free areas and in vaccinated cattle. This assay has the added advantage that no infectious or noninfectious virus is involved during antigen production.

PATTNAIK, B., RAI, D. V., VENKATARAMANAM, R.

Texto en inglés. *Indian J. Anim. Sci.*, 61 (3): 235-240, 1991. In: *Vet. Bull.*, 62 (12), 1992. Indian Veterinary Research Institute, Mukteswar-Kumaon, Uttar Pradesh 263 138, India.

***Especificidad de antígeno de aftovirus y reacción de anticuerpos en ELISA de fase líquida.***

Se usó el antígeno del aftovirus, tanto en la forma de epitelio lingual bovino infectado como fluidos de BHK-21 infectado, en ELISA de fase líquida y ELISA sandwich indirecta. La reacción perfil en ambas pruebas fue prácticamente idéntica, pero la de ELISA de fase líquida dio valores de densidad óptica menores en todas las combinaciones de antígeno-anticuerpo, indicando que la técnica es más discriminante en lo que se refiere a especificidad de anticuerpo.

***Specificity of foot-and-mouth disease virus antigen and antibody reaction in liquid phase ELISA.***

Foot-and-mouth disease (FMD) virus antigen, both in the form of infected cattle tongue epithelium (TE) and infected BHK-21 fluid, was used in liquid-phase ELISA and indirect sandwich ELISA. The reaction profile in both the ELISA was almost identical, but liquid-phase ELISA gave lower optical density values at any antigen-antibody combination indicating that the technique was more discriminating as far as antibody specificity was concerned.

PAY, T. W. F., HINGLEY, P. J.

Texto en inglés. *Vaccine*, 10 (10): 699-706, 1992. Clarendon Drive, Woking, Surrey GU22 7SQ, UK.

***Pruebas de potencia de vacuna antiaftosa en bovinos: la interrelación de la dosis de antígeno, respuesta de anticuerpos seroneutralizantes y protección al desafío.***

El uso de pruebas en bovinos continúa siendo la base para evaluar la potencia de vacunas antiaftosa para uso en bovinos. Para poder comparar los diferentes tipos de pruebas de potencia es imprescindible tener un buen conocimiento de cómo las respuestas mesurables a la vacunación en bovinos están relacionadas entre sí.

***Foot and mouth disease vaccine potency tests in cattle: the interrelationship of antigen dose, serum neutralizing antibody response and protection from challenge.***

The use of tests in cattle remains the basis for evaluating the potency of foot and mouth disease (FMD) vaccines intended for use in cattle. To be able to compare different types of potency test it is essential to have a good understanding of how measurable responses in cattle to vaccination relate to one another.

En este trabajo se examinan las interrelaciones de log dosis antígeno ( $V_{50}$ ), respuesta de anticuerpos seroneutralizantes ( $SN_{50}$ ), y protección al desafío (probit), luego de una única dosis de vacunación primaria. Se obtuvieron estimativas de las curvas para cada una de las tres regresiones y estas, junto con los valores descriptos por otros autores, se usaron para evaluar la bondad de algunas pruebas de potencia para vacunas antiaftosa en relación a las Recomendaciones que la Oficina Internacional de Epizootias realizó en 1975.

In this paper the interrelationships were examined of log antigen dose ( $V_{50}$ ), serum neutralizing antibody response ( $SN_{50}$ ), and protection from challenge (probit), following a single-dose primary vaccination. Estimates of the slopes for each of the three regressions were obtained and these, together with values described by other authors, were used to evaluate how well some of the potency tests for FMD vaccines matched up to Recommendations of the Office International des Epizooties made in 1975.

RODRIGUEZ, A., MARTINEZ-SALAS, E., DOPAZO, J., DAVILA, M., SAIZ, J. C., SOBRINO, F.

Texto en inglés. *Virology*, 189 (1): 363-367, 1992. Dep. Sanidad Anim., CIT-INIA, C/Embajadores 68, Madrid 28012, España.

***Diseño de un "primer" para el diagnóstico específico por PCR de virus de ARN altamente variables: tipificación de aftovirus.***

Se desarrolló un ensayo PCR para la detección específica e identificación de secuencias virales que correlacionan con serotipos de aftovirus. Para el diseño del "primer" se usó un nuevo análisis basado en perfiles homólogos entre las secuencias informadas. Para la amplificación por PCR se usaron las regiones del genoma de la replicasa de ARN (3D) que mostraron alta homología entre aftovirus, y baja homología respecto de otros picornavirus. Se logró una detección específica y altamente sensible para el ARN de aftovirus del tipo C, A y O, tanto purificados como extraídos de vesículas de animales infectados, bajo condiciones de reacción que permitían la detección de variantes presentes en poblaciones de virus. Similarmente, "primers" de serotipo específico fueron diseñados para ampliar el terminal carboxi del genoma VP1 del aftovirus tanto del tipo C, A, como del O. Los resultados de la amplificación por PCR de 15 ARNs diferentes de aftovirus usando "primers" tipo -específicos están de acuerdo con la tipificación serológica de los virus correspondientes y muestran que el procedimiento de selección de "primer" desarrollado para aftovirus constituye un método seguro de diagnóstico de virus.

***Primer design for specific diagnosis by PCR of highly variable RNA viruses: typing of foot-and-mouth disease virus.***

A PCR assay for the specific detection and identification of viral sequences that correlate with established serotypes of foot-and-mouth disease virus (FMDV) has been developed. A new analysis based on homology profiles among reported sequences was used for primer design. RNA replicase (3D) gene regions that showed high homology among FMDVs, and low homology to other picornaviruses, were used for PCR amplification. Specific and highly sensitive detection was achieved for RNA of FMDV types C, A, and O, either purified or extracted from vesicular fluids of infected animals, under reaction conditions permissive for the detection of variants present in the virus population. Similarly, serotype-specific primers were designed to amplify the carboxy-terminal end of VP1 gene of FMDV types either C, A, or O. The results of PCR amplification of 15 different FMDV RNAs using type-specific primers are in agreement with the serological typing of the corresponding viruses and show that the primer-selection procedure developed for FMDV constitutes a reliable method of viral diagnosis.



SANSON, R. L., LIBERONA, H., MORRIS, R. S.

Texto en inglés. *Prev. Vet. Med.*, 11 (3-4): 309-313, 1991. Dep. Vet. Clin. Sciences, Massey Univ. Palmerston North, New Zealand.

***El uso de un sistema de información geográfica en el manejo de epidemia de aftosa.***

En la Universidad Massey, a solicitud del Ministerio de Agricultura y Pesca de Nueva Zelanda, se está desarrollando un sistema de soporte para el manejo de una epidemia de fiebre aftosa. El sistema comprenderá una variedad de tecnologías computarizadas, que incluyen un sistema de manejo de datos, un sistema de información geográfica, un modelo de simulación espacial para fiebre aftosa, y numerosos sistemas prácticos.

***The use of a geographical information system in the management of a foot-and-mouth disease epidemic.***

A decision support system for managing a foot-and-mouth disease epidemic is being developed at Massey University on behalf of the New Zealand Ministry of Agriculture and Fisheries. The system will comprise a variety of computer technologies, including a database management system, a geographic information system, a spatial simulation model of foot-and-mouth disease and a number of expert systems.

SRINIVASAN, V. A., REDDY, G. S., NAGAI AH, K.

Texto en inglés. *Indian Vet. J.*, 69 (4): 294-296, 1992. In: *Vet. Bull.*, 62 (12), 1992. Indian Immunologicals, Hyderabad 500133, India.

***Tipificación de aftovirus por ELISA.***

Se comparó una prueba de microfijación del complemento (CFT) con una prueba ELISA sandwich indirecta para tipificar aftovirus, usando 72 muestras (incluyendo tejido epitelial y sobrenadantes de cultivo de tejido). Por ELISA se pudieron tipificar 76,38% de los aislamientos y por CFT, 62,50%. Además de esta superioridad mostrada por ELISA en la tipificación, la prueba mostró ser más sensible y económica.

***Typing of foot and mouth disease virus by enzyme-linked immunosorbent assay.***

A comparison of the micro complement fixation test (CFT) and an indirect sandwich ELISA for typing foot and mouth disease virus was made using 72 samples (including epithelial tissue and tissue culture supernatants). By ELISA 76.38% of the isolates could be typed and by CFT 62.50%. In addition to this superiority in typing, the ELISA was also more sensitive and economical.

USDA/APHIS

Texto en inglés. Hyattsville, MD, USDA/Animal and Plant Health Inspection Service, 144p., October 1991.

***Fiebre aftosa. Guías de enfermedades emergenciales.***

Las "Guías para Erradicación de la Fiebre Aftosa" son dedicadas a proveer, a los funcionarios estatales y federales de salud animal, con lineamientos generales sobre operaciones de emergencia y la organización necesaria para el diagnóstico, control y erradicación de la fiebre aftosa. Al ser preparadas para responder rápida y decididamente sobre la introducción de enfermedades exóticas en los Estados Unidos, reducirán el costo de campañas de erradicación y las consecuencias

***Foot-and-mouth disease. Emergency disease guidelines.***

The "Foot-and-Mouth Disease Guidelines for Eradication" are intended to provide State and Federal Animal Health officials with general guidelines on emergency operations and the organization required for diagnosis, control and eradication of Foot-and-Mouth Disease. Being prepared to respond rapidly and decisively to exotic disease introductions into the United States will reduce the cost of eradication campaigns and the economic consequences. It is important

económicas. Es importante que existan planes cooperativos para la ocurrencia potencial, y que los recursos disponibles sean combinados para responder de forma efectiva y eficiente. Cuando sea necesario, los desvíos de estas guías no deben ser limitados o prevenidos, sino que deben adaptarse a determinadas situaciones y deberán servir de base para tomar decisiones seguras. La detección temprana de introducciones de enfermedades exóticas es muy importante. La vigilancia constante, por veterinarios acreditados, para detectar e informar inmediatamente cualquier caso sospechoso de fiebre aftosa, u otra enfermedad exótica, debe ser promocionada continuamente. Estos informes deben ser investigados inmediatamente por especialistas en enfermedades exóticas de animales. La capacidad de un diagnóstico diferencial competente debe ser mantenida para la realización de un diagnóstico de laboratorio conciso y rápido. La guía introduce dos opciones a las previamente consideradas como aceptables para la eliminación de la fiebre aftosa de los Estados Unidos: conservación de proteína animal y vacunación (Secciones 6.10 y 7.10.13).

Este manual está dedicado a los veterinarios que tuvieron el conocimiento y previsión de promover aquellas medidas necesarias para mantener a los Estados Unidos libre de enfermedades exóticas de animales, que serían devastadoras para la industria ganadera. El desafío de los veterinarios en el futuro será continuar esta filosofía y proveer la protección que se requiera.

that there be cooperative planning for the potential occurrence, and that available resources be combined to respond effectively and efficiently. Deviations from these guidelines should not be limited or prevented when it is necessary in order to adapt to a given situation, but the guidelines should serve as the basis for making sound decisions. Early detection of exotic disease introductions is extremely important. Constant vigilance by Accredited Veterinarians to detect and report immediately any suspicious cases of Foot-and-Mouth Disease, or other exotic disease, must be continually promoted. Such reports must be investigated immediately by trained Foreign Animal Disease Diagnosticians. Competent differential diagnostic capability must be maintained for accurate and prompt field and laboratory diagnosis. The guideline introduces two ground-breaking options to those previously considered acceptable for the elimination of Foot-and-Mouth Disease from the United States: animal protein conservation and vaccination (Sections 6.10 and 7.10.13).

This manual is dedicated to the veterinarians who have had the knowledge and foresight to promote those measures necessary to maintain the United States free of foreign animal diseases which would be devastating to the livestock industry. The challenge of veterinarians of the future is to continue this philosophy and provide the protection that is demanded.

#### *Reconocimientos*

El Comité Editorial agradece el aporte de Maria da Penha Monteiro da Silva y Perla Garcia Vaccaro (edición y revisión), Astrid Rocha Pimentel (bibliografías), Ronaldo de Albuquerque (fotografía), y Carla Prete Gonçalves (dactilografía). Los trabajos de fotolitografía, impresión, compaginación, encuadernación y envío se realizaron por Raimundo Gervasio da Silva, Ivanildo de Azevedo, A. A. Gomes, C.A.C. de Paulo, y S. Pedro.

#### *Acknowledgements*

The Editorial Committee is grateful to Maria da Penha Monteiro da Silva and Perla Garcia Vaccaro (editing and proofreading), Astrid Rocha Pimentel (bibliography), Ronaldo de Albuquerque (photography) and Carla Prete Gonçalves (dactilography). Photolithography, printing and binding were performed by Raimundo Gervasio da Silva, Ivanildo de Azevedo, A. A. Gomes, C.A.C. de Paulo, and S. Pedro.

## Bibliografía sobre enfermedades vesiculares

## Bibliography on vesicular diseases

- AGTERBERG, M., ADRIAANSE, H., BARTELING, S., VAN MAANEN K., TOMMASSEN, M.  
 (Protección de cobayos contra el virus de la fiebre aftosa con una proteína híbrida PhoE-aftovirus)  
 Protection of guinea-pigs against foot-and-mouth disease virus by immunization with a PhoE-FMDV  
 hybrid protein. *Vaccine*, 8 (5): 438-440, 1990. Institute of Molecular Biology and Medical Biotechnol-  
 ogy, University of Utrecht, Padualaan 8, 3584-CH Utrecht, Netherlands.
- AHL, R.  
 (Examen de muestras de semen bovino para recuperar aftovirus.) Examination of bovine semen  
 samples for recovery of FMD virus. In: *FAO. Rep. Ses. Res. Gp. Stand. Tech. Com. Europ. Comm.*  
*Control FMD*, Ankara, Turkey, 1-5 October 1991. p. 70-74.
- AHL, R., HAAS, B., LORENZ, R. J., WITTMANN, G.  
 (Evaluación de la potencia de vacunas antiaftosa por métodos indirectos.) Assessment of potency of  
 foot-and-mouth disease vaccines by indirect methods. In: *11th International Symposium of the World*  
*Association of Veterinary Microbiologists, Immunologists and Specialists in Infectious Diseases*,  
 Perugia, Mantova, Italy, October 2-6, 1989. In: *Index Vet.*, 60 (3), 1992. Società Editrice Esculapio,  
 40131 Bologna, Italia.
- AMADORI, M.  
 (Suspensión de la vacunación antiaftosa en Italia. Problemas y perspectivas. Suspension of anti-foot  
 and mouth disease vaccination in Italy. Problems and prospects. Texto en italiano. *Nuovo Progresso*  
*Veterinario* 46, (10): 333-334, 1991. In: *Index Vet.*, 60 (5), 1992.
- AMADORI, M., ARCHETTI, I. L., VERARDI, R., BERNERI, C.  
 Aislamiento de células mononucleares citotóxicas de bovinos vacunados contra la fiebre aftosa.)  
 Isolation of mononuclear cytotoxic cells from cattle vaccinated against foot-and-mouth disease. *Arch.*  
*Virol.*, 122 (3-4): 293-306, 1992. Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia,  
 via A. Bianchi 7, 25100, Brescia, Italia.
- ANTONI, F., SOÓS, T., VARGA, J., MÉSCS, I., PENKE, B., TUBOLY, S.  
 (Experiencias sobre la eficacia de vacunas antiaftosa experimentales de péptidos sintéticos.) Experi-  
 ences on the efficacy of experimental synthetic peptide vaccines against foot-and-mouth disease. In:  
*11th International Symposium of the World Association of Veterinary Microbiologists, Immunologists*  
*and Specialists in Infectious Diseases*, Perugia, Mantova, Italy, October 2-6, 1989. In: *Index Vet.*, 60  
 (3), 1992. Società Editrice Esculapio 153, 40131 Bologna, Italia.

- ARAB, R. M. H., ABOU-ZEID, A. A., OMAR, A., SOUFY, H., EL-KHOLY, A. A.  
(Efecto de las vacunas antiaftosa y BCG en el cuadro sanguíneo de novillos desafiados con virus de la fiebre aftosa.) Effect of FMD and BCG vaccines on the blood picture of calves challenged with FMD virus. *Egyptian J. Comp. Path. Clin. Path.*, 5 (1): 11-24, 1992. In: *Vet. Bull.*, 62 (12), 1992. Dept. Vet. Med. Poultry Dis., Faculty of Veterinary Medicine, Cairo University, Cairo, Egypt.
- ARAMBULO III, P. V., ASTUDILLO, V.  
(Perspectivas sobre la aplicación de percepción a distancia y sistema de información geográfica para control de enfermedad y manejo de salud.) Perspectives on the application of remote sensing and geographic information systems to disease control and health management. *Prev. Vet. Med.*, 11: 345-352, 1991.
- ARAMBURU, H.G.  
Difusión de la fiebre aftosa (Diffusion of foot and mouth disease.) *Rev. Med. Vet. (Bs. Aires)*, 72 (2): 54-56, 1992. In: *Index Vet.*, 60 (10), 1992.
- ARMSTRONG, R. M., CROWTHER, J. R., DENYER, M.S.  
(Detección de anticuerpos contra el virus de la fiebre aftosa por ELISA en eluidos de papel de filtro de sueros porcinos o sangre completa.) The detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus (FMDV) in filter paper eluates from pig sera or whole blood by ELISA. *J. Virol. Meth.*, 34 (2): 181-192, 1991. AFRC Institute for Animal Health, Ash Road, Pirbright, Woking, Surrey, UK.
- ARMSTRONG, R. M., RENDLE, R. A. S. T., FERRIS, N. P., SAMUEL, A. R., KNOWLES, N. J.  
(Estudios genéticos y antigénicos de aftovirus aislados de muestras recolectadas en Turquía en 1991.) Genetic and antigenic studies of FMDV isolated from samples collected in Turkey in 1991. In: *FAO. Rep. Ses. Res. Gp. Stand. Tech. Com. Comm. Control FMD*, Ankara, Turkey, 1-5 October 1991. p. 63-69.
- BARTELING, S. J., VREESWIJK, J.  
(Desarrollo de vacunas antiaftosa.) Developments in foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine*, 9 (2): 75-88, 1991.
- BELSHAM, G. J.  
(Se seleccionan sitios dobles de inicio de síntesis de proteínas en el ARN del aftovirus tras su entrada interna y examen de ribosomas *in vivo*.) Dual initiation sites of protein synthesis on foot-and-mouth disease virus RNA are selected following internal entry and scanning of ribosomes *in vivo*. *EMBO Journal*, 11 (3): 1105-1110, 1992. In: *Vet. Bull.*, 62 (7), 1992. AFRC Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory, Pirbright, Woking, Surrey GU24 ONF, UK.
- BELSHAM, G., ABRAMS, C. C., KING, A. M. Q., ROOSIEN, J., VLAK J. M.  
(La miristolación de precursores de la cápside de la proteína del aftovirus es independiente de las otras proteínas virales y ocurre en células de mamíferos e insectos.) Myristoylation of foot-and-mouth disease virus capsid protein precursors is independent of other viral proteins and occurs in both mammalian and insect cells. *J. Gen. Virol.*, 72 (3): 747-751, 1991. AFRC Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory Pirbright, Woking, Surrey GU24 ONF, UK.

- BERENTSEN, P. B. M., DUKHUIZEN, A. A., OSKAM, A. J.  
 (Análisis económico de reglamentos veterinarios en mercados parcialmente integrados: el caso de la fiebre aftosa.) Economic analysis of veterinary regulations in partly integrated markets: the case of foot and mouth disease. *Tijdschrift voor Sociaal Wetenschappelijk Onderzoek van de Landbouw*, 6 (2): 89-112, 1991. In: *Index Vet.*, 60 (3), 1992. Department of Farm Management, Wageningen, Agricultural University, 6706 KN Wageningen, Hallandsweg, 1, Netherlands.
- BERINSTEIN, A., PIATTI, P., GAGGINO, O. P., SCHUDEL, A. A., SADIR, A. M.  
 (Aumento de la respuesta inmunitaria producida con vacunas antiaftosa por un extracto del *Mycobacterium sp.*) Enhancement of the immune response elicited with foot-and-mouth disease virus vaccines by an extract of the *Mycobacterium sp. wall.* *Vaccine*, 9 (12): 883-888, 1991. Institute of Virology, CICV, Inta-Castelar, CC77 (1708) Morón, Argentina.
- BLAJAN, L., CALLIS, J.  
 (Comercio internacional y fiebre aftosa.) International trade and foot and mouth disease (FMD). *Proceedings Annual Meeting of the United States Animal Health Association 95*: 240-260, 1991. In: *Index Vet.*, 60 (9), 1992.
- BOKHOVEN, H. VAN, MULDER, M., WELLINK, J., VLAK, J. M., GOLDBACH, VAN KAMMEN A.  
 (Evidencia de propiedades disimilares de polimerasas de ARN de comovirus y picornavirus.) Evidence for dissimilar properties of comoviral and picornaviral RNA polymerases. *J. Gen. Virol.*, 72 (3): 567-572, 1991. Dep. Mol. Biol. Agric. Univ. Dreyenlaan, 3, 6703 HA Wageningen, Netherlands.
- BOLWELL, C., PARRY, N. R., ROWLANDS, D. J.  
 (Comparación entre títulos de neutralización *in vitro* y protección *in vivo* contra el desafío homólogo y heterólogo inducido por vacunas preparadas con dos variantes serológicas distantes del aftovirus, serotipo A22.) Comparison between *in vitro* neutralization titres and *in vivo* protection against homologous and heterologous challenge induced by vaccines prepared from two serologically distinct variants of foot-and-mouth disease virus, serotype A22. *J. Gen. Virol.*, 73 (3): 727-731, 1992. Department of Virology, Wellcome Research Laboratories, Langley Court, Beckenham, Kent BR3 3BS, UK.
- BRINDEIRO, R. M., SOARES, M. A., PACHECO, A. B. P., PONTES, O. H. A. DE, ALMEIDA, D. F. DE, TANURI, A.  
 (Expresión en *Escherichia coli* de una polimerasa activa del ARN de aftovirus.) Expression of an active foot-and-mouth disease virus RNA polymerase in *Escherichia coli*. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 24 (4): 359-363, 1991. In: *Vet. Bull.*, 62 (8), 1992. Departamento de Parasitologia e Biofísica Celular, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941 Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- BRINDEIRO, R. DE M., SOARES, M. A., VIANNA, A. L. M. A., PONTES, O. H. A. DE, PACHECO, A. B. F., ALMEIDA, D. F. DE, TANURI, A.  
 (Mutagenesis dirigida al sitio de la polimerasa del ARN del gen del aftovirus.) Site-directed mutagenesis of the foot-and-mouth disease virus RNA-polymerase gene. *Rev. Bras. Gen.*, 14 (2): 273-286, 1991. In: *Vet. Bull.*, 62 (10), 1992. Laboratório de Fisiologia Celular, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, 21941 Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

BROWN, F.

(Péptidos como vacunas virales: lecciones de experimentos con aftovirus.) Peptides as viral vaccines: lessons from experiments with foot-and-mouth disease virus. *World J. Microb. Biotech.*, 7 (2): 110-114, 1991. In: *Index Vet.*, 60 (1), 1992. Department of Microbiology, University of Surrey, Guildford, Surrey GU2 5XH, UK.

BROWN, F.

(Avances en vacunación antiaftosa.) Advances in vaccination for foot and mouth disease. *Proceedings Annual Meeting of the United States Animal Health Association*, 95: 189-193, 1991. In: *Index Vet.*, 60 (9), 1992.

BROWN, C. C., OLANDER, H. J., MEYER, R. F.

(Estudio preliminar de la patogénesis del aftovirus usando hibridación *in situ*.) A preliminary study of the pathogenesis of foot-and-mouth disease virus using *in situ* hybridization. *Vet. Pathol.*, 28 (3): 216-222, 1991. In: *Viol. Abst.*, 25 (5), 1992. Foreign Anim. Dis. Diagn. Lab., Natl. Vet. Serv. Lab. APHIS, P. O. Box 848, Greenport, NY 11944, USA.

CAPRILLO, C., PLANA, J., MASCARELLA, R., BERGADÁ, J., SOBRINO, F.

(Variación genética y fenotípica durante replicación de aftovirus porcino.) Genetic and phenotypic variability during replication of foot-and-mouth disease virus swine. *Virology*, 179 (2): 890-892, 1990. Departamento de Sanidad Animal, INIA C/Embajadores 68, 28012 Madrid, España.

CARREÑO, C., ROIG, X., CAIRO, J., CAMARERO, J., MATEU, M. G., DOMINGO, E., GIRALT, E., ANDREU, D.

(Estudios de variación antigénica de cepas C de aftovirus por péptidos sintéticos y anticuerpos monoclonales.) Studies on antigenic variability of C strains of foot-and-mouth disease virus by means of synthetic peptides and monoclonal antibodies. *Int. J. Peptide Protein Res.*, 39 (1): 41-47, 1992. In: *Viol. Abst.*, 25 (8), 1992. Dep. Org. Chem., Univ. Barcelona, Martí i Franques 1, E-08028 Barcelona, España.

CHARKRABORTY, T., MAJUMDER, B. K.

(Fiebre aftosa en un elefante del zoológico de Calcuta: informe de un caso.) Foot and mouth disease in an elephant in Calcutta zoological garden: a case report. *Indian Vet. Med. J.*, 14 (3): 213-214. In: *Index Vet.*, 60 (9), 1992.

CHOUDHURY, J. M., BARMAN, N. N., SHARMA, D. K., DUTTA, P. K., BORO, B. R.

(Respuesta inmunitaria de vacuna antiaftosa polivalente en búfalos.) Immune response of foot-and-mouth disease polyvalent vaccine in buffalo calves. *Indian J. Virol.*, 6 (1/2): 12-16, 1990. In: *Vet. Bull.*, 62 (7), 1992. Department of Microbiology, Assam Agricultural University, Khanapara, Guwahati - 781 022, India.

COLLEN, T., DIMARCHI, R., DOEL, T. R.

(Un epítipo de célula T en el VP1 de aftovirus es inmunodominante para bovinos vacunados.) A T cell epitope in VP1 of foot-and-mouth disease virus is immunodominant for vaccinated cattle. *J. Immunol.*, 146 (2): 749-755, 1991.

DOEL, T. R., PULLEN, L.

(Banco internacional para vacuna antiaftosa: estudios de estabilidad con concentrados de virus y vacunas preparadas con ellos.) International bank for foot-and-mouth disease vaccine: stability studies with virus concentrates and vaccines prepared from them. *Vaccine*, 8 (5): 473-478, 1991.

O'CONNOR, P. J.

(Cincuenta años de fiebre aftosa.) Foot and mouth disease - fifty years on. *Irish Vet. News*, 13 (10): 45-46, 1991. In: *Index Vet.*, 60 (3), 1992.

CONRAD, U., BECKER, K., ZIEGNER, M., WALTER, G.

(Inmunoglobulina VH y genes VK de BALB/c a la respuesta del VP1 del anti-virus de la fiebre aftosa (O1): clonaje, caracterización y ratones transgénicos.) Immunoglobulin VH and VK genes of the BALB/c anti-foot-and-mouth disease virus (O1) VP1 response: Cloning, characterization and transgenic mice. *Mol. Immunol.*, 28 (11): 1201-1209, 1991. In: *Viol. Abst.*, 25 (6), 1992. Inst. Genet. and Plant Res., Corrensstr. 3, D(O)-4325 Gatersleben, FRG.

CROWTHER, J. R., ANGARITA, L., ANDERSON, J.

(Evaluación del uso de sustratos cromogénicos y fluorogénicos en pruebas ELISA de fase sólida.) Evaluation of the use of chromogenic and fluorogenic substrates in solid-phase enzyme linked immunosorbent assays (ELISA). *Biologicals*, 18 (4): 331-336, 1990. In: *Index Vet.*, 62 (5), 1992. Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory, Pirbright, Nr. Woking, Surrey, GU24 0NF, UK.

D'ANGELO, D., FRITTOLI, M.

(Aspectos técnicos y legislativos del manejo de carcasas de animales con fiebre aftosa.) Technical and legislative aspects of the disposal of the carcasses of animals with foot and mouth disease. Texto en italiano. *Nuovo Progresso Veterinario*, 45 (17): 583-586, 589-590, 1990. In: *Index Vet.*, 60 (7), 1992.

DEHOUEW, J.P., HOUNSOU-VE, G.

(Epidemia de fiebre aftosa en el norte de Benin durante la estación seca de 1990-91. Epidemic of foot and mouth disease in North Benin during the dry season of 1990-91.) Texto en francés. *Rev. d'Élev. Méd. Vet. Pays Trop.*, 44(3): 261-262, 1992. In: *Vet. Bull.*, 62(11), 1992. Projet developpement pastoral, BP 23, Parakou, Benin.

DEXTER, E.

(El control de la fiebre aftosa en la Comunidad Económica Europea [CEE].) The control of foot and mouth disease (FMD) in the European Economic Community (EEC). In: *11th International Symposium of the World Association of Veterinary Microbiologists, Immunologists and Specialists in Infectious Diseases*, Perugia, Mantova, Italy, October 2-6, 1989. In: *Index Vet.*, 60 (3), 1992. Società Editrice Esculapio, 40131 Bologna, Italia.

DIMITRIADIS, I.

(Demostración de anticuerpos neutralizantes tras una única vacunación antiaftosa con virus tipo Asia 1 en el campo. Demonstration of neutralizing antibodies in sheep after a single vaccination against foot and mouth disease virus type Asia 1 in the field.) Texto en alemán. *Monatshefte für Veterinarmedizin*, 46 (15): 542-544, 1991. In: *Vet. Bull.*, 62 (2), 1992. Department of Microbiology, Aristotelian University, Thessaloniki, Greece.

**DIMITRIADIS, I.**

(Laboratorio de diagnóstico de fiebre aftosa y la enfermedad vesicular del cerdo en Grecia en 1962-1988. Laboratory diagnosis of foot and mouth disease and swine vesicular disease in 1962-1988 in Greece.) Texto en alemán. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, 104 (6): 194-199, 1991. In: *Vet. Bull.*, 63 (2), 1992. Aristotelian University, Veterinary School, Thessaloniki, Greece.

**DIMITRIADIS, I., CHONDROKOUKI, E.**

(Detección en novillos de anticuerpos neutralizantes contra el virus de la fiebre aftosa tipo Asia I en el campo. Detection of neutralizing antibodies in calves vaccinated against FMD-Type Asia I in the field.) Texto en alemán. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, 104 (9): 313-316, 1991. In: *Index Vet.*, 60 (7), 1992. Institut fur MKS Ag.Paraskevi, Attiki, Lydoudi 57, N. Krini, GR-55, 132 Thessaloniki, Greece.

**DRIMITRIADIS, I. A., DELIMPALTAS, P.**

(Problemas tras vacunación antiaftosa en una zona tampón en Grecia, durante 1972-1989. Problems after vaccination against foot and mouth disease in a buffer zone in Greece, during 1972-1989.) Texto en griego. *Deltion tes Ellenikes Kteniatrikes Etaireias = Bulletin of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 42 (2): 115-118, 1991. In: *Index Vet.*, 62 (5), 1992. Tmima Kteniatrikes, Aristotelian University, Thessaloniki, Greece.

**DOEL, T. R., DOEL, C. M. F. A., STAPLE, R. F., DIMARCHI, R.**

(Reacción cruzada y anticuerpos serotipo específicos contra el aftovirus generados por diferentes regiones en el mismo péptido sintético.) Cross-reactive and serotype-specific antibodies against foot-and-mouth disease virus generated by different regions of the same synthetic peptide. *J. Virol.*, 66 (4): 2187-2194, 1992. Pirbright Laboratory, Institute for Animal Health, Ash Road, Pirbright, Woking, Surrey GU24 0NF, UK.

**DOMINGO, E., ESCARMIS, C., MARTINEZ, M. A., MARTINEZ-SALAS, E.**

(Poblaciones de aftovirus son cuasiespecies.) Foot-and-mouth disease virus populations are quasispecies. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 176: 33-47, 1992. In: *Index Vet.*, 60 (9), 1992.

**DOMINGO, E., MARTINEZ, M. A., HERNANDEZ, J., BORREGO, B., PICCONE, M. E., PALMA, E. L., KNOWLES, N., MATEU, M. G.**

(Estudio de una variación antigénica del serotipo C de aftovirus durante seis décadas: potencial para más variaciones e implicaciones en la selección de cepas vacunales.) A study of the antigenic variation of FMDV of serotype C over six decades: potential for further variation and implications for the choice of vaccine strains. In: *FAO. Rep. Ses. Res. Gp. Stand. Tech. Com. Europ. Comm. Control FMD*, Ankara, Turkey, 1-5 October 1991. p. 36-38.

**DONALDSON, A. I.**

(Estandarización de métodos para diagnóstico de fiebre aftosa.) Standardisation of diagnostic methods for foot-and-mouth disease. In: *11th International Symposium of the World Association of Veterinary Microbiologists, Immunologists and Specialists in Infectious Diseases*, Perugia, Mantova, Italy, October 2-6, 1989. In: *Index Vet.*, 60 (3), 1992. Società Editrice Esculapio 40131 Bologna, Italia.



DONALDSON, A. I., DONN, A.

(Epidemiología de la fiebre aftosa en Europa. Epidemiology of foot and mouth disease in Europe.) Texto en italiano. *Nuovo Progresso Veterinario*, 46 (1): 25-28, 1990. In: *Index Vet.*, 60 (7), 1992.

DUBOURGET, P., LOMBARD, M.

(Fiebre aftosa - la estandarización de reaccionantes y métodos, un método útil para selección de cepas vacunales.) Foot and mouth disease - the standardization of reagents and methods, a useful tool for selection of vaccine strains. In: *11th International Symposium of the World Association of Veterinary Microbiologists, Immunologists and Specialists in Infectious Diseases*, Perugia, Mantova, Italy, October 2-6, 1989. In: *Index Vet.*, 60 (3), 1992. Società Editrice Esculapio 40131 Bologna, Italia.

FALK, M. M., SOBRINO, F., BECK, E.

(Amplificación del gen VPg se correlaciona con la formación de partícula infecciosa del aftovirus.) VPg gene amplification correlates with infective particle formation in foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.*, 66 (4): 2251-2260. Biochemisches Institut am Klinikum der Universität Giessen Friedrichstrasse 24, D-6300 Giessen, Germany.

FAO

(Epidemiología de brotes recientes de fiebre aftosa en Turquía, y características de aislamientos de campo en bovinos y pequeños ruminantes.) Epidemiology of recent FMD outbreaks in Turkey, and characteristics of field isolates with reference to both cattle and small ruminants. In: *FAO. Rep. Ses. Res. Gp. Stand. Tech. Com. Europ. Comm. Control FMD*, Ankara, Turkey, 1-5 October 1991. p. 46-62.

FAO

(Condiciones mínimas para importar a Europa animales vivos, carne fresca y vísceras de bovinos, ovinos, caprinos y porcinos.) Minimum conditions for the importation into Europe of live animals, fresh meat and offal of the bovine, ovine, caprine and porcine species. In: *FAO. Rep. Ses. Res. Gp. Stand. Tech. Com. Europ. Comm. Control FMD*, Ankara, Turkey, 1-5 October 1991. p. 39-45.

FAO

(Recomendaciones para los planes de contingencia de fiebre aftosa, incluyendo acciones en países que no vacunan.) Recommendations for FMD contingency plans including actions in non-vaccinating countries. In: *FAO. Rep. Ses. Res. Gp. Stand. Tech. Com. Eur. Comm. Control FMD*, Ankara, Turkey, 1-5 October 1991. p. 10-27.

FAO

(Estándares de seguridad para laboratorios de fiebre aftosa.) Security standards for FMD laboratories. In: *FAO. Rep. Ses. Res. Gp. Stand. Tech. Com. Eur. Comm. Control FMD*, Ankara, Turkey, 1-5 October 1991.

FLECKINGER, R.

(Sistema francés para controlar fiebre aftosa, 1962-90. I. Situación antes de 1962. Sistema francés de control; diferentes medidas y efecto sobre la incidencia. French system of controlling foot and mouth disease, 1962-90. I. Situation before 1962. French system of control; different measures and effect on incidence.) Texto en francés. *Bulletin Mensuel de la Société Vétérinaire Pratique de France*, 75 (10): 531-550, 1991. In: *Index Vet.*, 60 (6), 1992.

FLECKINGER, R.

(Sistema francés de control de fiebre aftosa, 1962-90. II. French system of foot and mouth disease control, 1962-90. II.) Texto en francés. *Bulletin Mensuel de la Société Vétérinaire Pratique de France*, 76 (1): 49-50, 52-63. In: *Index Vet.*, 60 (7), 1992.

FLOSS, G.

(Desarrollo y prueba de parámetros de calidad para la producción de vacuna antiaftosa. Development and testing of quality parameters for the production of vaccines against foot and mouth disease.) Texto en alemán. *Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität, München, Germany 11*, 1990, 122 p. In: *Index Vet.*, 60 (7), 1992.

FLYNN, J. N., HARKISS, G. D., MOORE, D., DIMARCHI R.

(Modulación de reacción de células T a péptidos sintéticos análogos al aftovirus en ovinos por sustitución de aminoácidos.) Modulation of T-cell reactivity to synthetic peptide analogues of foot-and-mouth disease virus in sheep by amino acid substitutions. *Vet. Immunol. Immunophatol.*, 31 (3-4): 255-266, 1992. ILRAD, P.O. Box 30709, Nairobi, Kenya.

FORMAN, A. J.

(Técnicas de diagnóstico de fiebre aftosa en el sudeste de Asia.) Diagnostic techniques for foot-and-mouth disease in Southeast Asia. *ACIAR Proceedings Series*, (27): 216-218, 1989. In: *Index Vet.*, 60 (1), 1992.

FRANCIS, M. J., HASTINGS, G. Z., BROWN, F., MCDERMED, J., LU, Y. A., TAM, J. P.

(Evaluación inmunológica del sistema peptídico de antígeno múltiple usando el sitio inmunogénico principal del aftovirus.) Immunological evaluation of the multiple antigen peptide (MAP) system using the major immunogenic site of foot-and-mouth disease virus. *Immunology*, 73 (3): 249-254, 1990. Dept. Virol. and Process Dev., Pitman-Moore Ltd., Breakspear Rd. S., Harefield, Uxbridge, Middlesex UB9 6LS, UK.

GAGGINO, O. P., MARCOVECCHIO, F. E., MONESIGLIO, J. C., BORCA, M. V.

Respuesta inmune en ratones inducida por diferentes dosis del virus de la fiebre aftosa. (Immune response in mice induced by different doses of foot and mouth disease vaccine.) *Revista Argentina de Microbiología*, 23 (1): 22-25, 1991. In: *Index Vet.*, 60 (9), 1992.

GANGOPADHYAY, N. N., SHARMA, S. K., PATHAK, R. C.

(Actividad antiviral del levamisol y sal de zinc en infección experimental con aftovirus en ratones recién nacidos y cobayos.) Antiviral activity of levamisole and zinc salt on experimental foot-and-mouth disease (FMD) virus infection in baby mice and guinea pigs. *Indian J. Virol.*, 6 (1/2): 117-22, 1990. In: *Vet. Bull.*, 62 (7), 1992. Department of Veterinary Microbiology, Mathura Veterinary College, Mathura, Uttar Pradesh, India.

GEL'FANOV, V. M., GRECHANINOVA, L. A., KAN, E. S., YAROV, A. V., SUROVOI, A. YU, VOL'PINA, O. M., CHEPURKIN, A. V., IVANAOV, V. T.

(Estructura antigénica del aftovirus. VI. Sitios funcionales de la región inmunodominante de la proteína VP<sub>1</sub> en las cepas O<sub>1</sub> y A<sub>22</sub>.) Antigenic structure of the foot and mouth disease virus. VI. Functional sites of the immunodominant region of VP<sub>1</sub> protein in O<sub>1</sub> and A<sub>22</sub> strains. *Bioorganicheskaya Khimiya*, 17 (5): 596-605, 1991. In: *Index Vet.*, 60 (3), 1992.

- GIAVEDONI, L. D., KAPLAN, G., MARCOVECCHIO, F. *et al.*  
(Protección conferida por las proteínas de fusión TrpE conteniendo porciones de la región terminal C de la proteína VP<sub>1</sub> de la cápside del aftovirus.) Protection conferred by TrpE fusion proteins containing portions of the C-terminal region of capsid protein VP<sub>1</sub> of foot-and-mouth disease virus. *J. Gen. Virol.*, 72(4): 967-971, 1991.
- GLASS, E. J., OLIVER, R. A., COLLEN, T., DOEL, T. R., DIMARCHI, R., SPOONER, R. L.  
(Restringido a la clase II de MHC el reconocimiento de péptidos de aftovirus por células T de bovinos.) MHC class II restricted recognition of FMDV peptides by bovine T cells. *Immunology*, 74 (4): 594-599, 1991.
- GOEL, Y. P.  
(Incidencia de fiebre aftosa en senderos de colinas de Uttar Pradesh - una nota.) Incidence of foot and mouth disease (FMD) in hill tract of Uttar Pradesh - a note. *Indian Vet. Med. J.*, 14 (3): 208-210, 1990. In: *Index Vet.*, 60 (9), 1992.
- GOEL, Y. P.  
(Algunas observaciones epizootológicas de brotes de fiebre aftosa en un rebaño organizado.) A note on some epizootiological observations on foot-and-mouth disease outbreak in an organised herd. *Indian Vet. Med. J.*, 13 (2): 127-129, 1989. In: *Index Vet.*, 60 (1), 1992. Foot-and-Mouth Disease Project, College of Veterinary Science and Animal Husbandry, Mathura, India.
- GUGIU, I., STIRBU, E., STIRBU, K., CHICIUDEAN, I., GUGIU, M.  
(Respuesta inmunitaria de bovinos vacunados contra la fiebre aftosa y rabia.) Immune response of cattle vaccinated against foot and mouth disease and rabies. *Archiva Veterinaria (Bucuresti)*, 19:13-19, 1990. In: *Index Vet.*, 60 (6), 1992. Institutul de Cercetari veterinare si Biopreparate "Pasteur", Bucuresti, Romania.
- GUILIANO, S.  
(Nuevas medidas prácticas y estratégicas para controlar la fiebre aftosa. New practical and strategic measures for controlling foot and mouth disease.) Texto en italiano. *Nuovo Progresso Veterinario*, 46 (1): 29-31, 1990. In: *Index Vet.*, 60 (7), 1992.
- GÜRHAN, S. I., AYNAGÖZ, G. D., AKTAS, S., (Eds.)  
*Ist International Foot and Mouth Disease Symposium*, 6-8 June 1989, Ankara, Turkey. In: *Index Vet.*, 60 (7), 1992. Aktas, S. Ankara, Turkey; Foot and Mouth Disease Institute, PK. 714, 06044 Ulus 220.
- HERNANDEZ, J., MARTÍNEZ, M. A., ROCHA, E., DOMINGO, E., MATEU, M. G.  
(Generación de un epítipo de neutralización subtipo específico en aftovirus de un subtipo distinto.) Generation of a subtype-specific neutralization epitope in foot-and-mouth disease virus of a different subtype. *J. Gen. Virol.*, 73 (1): 213-216, 1992. Centro de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid, Canto Blanco, 28049 Madrid, España.
- KALANIDHI, A. P., NAGAI AH, K., PALANISAMY, R., SRINIVASAN, V. A.  
(Control de elefantes, bovinos y ovinos de India por anticuerpos contra el antígeno asociado a la infección de aftovirus.) Screening of Indian elephants, cattle and sheep for antibodies to foot and mouth disease virus-infection associated antigen. *Indian Vet. J.*, 69 (5): 390-393, 1992. In: *Vet. Bull.*, 62 (12), 1992. Indian Immunologicals, Hyderabad 500133, India.

KENAWY, A. A., NOUH, S. R., KASSEM, M. M., BAUMI, A. E.

(Anormalidades "dew claw" y desarrollo excesivo en ovinos y caprinos.) Dew claw abnormalities and overgrowths in sheep and goats. *Assiut Veterinary Medical Journal*, 26 (51): 241-249. In: *Index Vet.*, 60 (12), 1992. Department of Surgery & Theriology, Faculty of Veterinary Medicine, Alexandria University, Alexandria, Egypt.

KHALIKOV, S. Kh., ISMAILOV, M. I., SHAKHMATOV, A. N., NEKRASOV, A. V., BORISOVA, V. N., EIVAZOVA, E. R.

(Preparación de conjugados de péptidos imitando parte de la sección de determinación antigénica de la proteína VP<sub>1</sub> del aftovirus A<sub>12</sub> con varios soportes.) Preparation of conjugates of peptides imitating part of the antigen-determinant section of protein VP<sub>1</sub> of foot-and-mouth disease virus A<sub>12</sub> with various supports. *Chemistry of Natural Compounds*, 26 (4): 436-440, 1990. In: *Vet. Bull.*, 62 (2), 1992. V. I. Lenin Tadjik State University, Dushanbe, Institute of Immunology, Ministry of Public Health, Moscow, USSR.

KHAN, N. A., CHOUDHRY, S. A., ABSUS-SATTAR, HUSSAN, A., ZIA-UL-HAQ, M., HAFFEZ, S. Q., AHMAD, M. M.

(Estudios tipográficos del aftovirus en Pakistán 1962-1988.) Typographical studies of foot and mouth disease virus in Pakistan 1962-1988. *Pakistan J. Vet. Res.*, 2 (1-2): 7-10, 1989. In: *Index Vet.*, 60 (10), 1992.

KIT, S., KIT, M., DIMARCHI, R. D., LITTLE, S.P., GALE, C.

(Vacuna de virus vivo modificado de rinotraqueitis infecciosa bovina expresando formas monomérica y dimérica de epítopes de proteínas de la cápside de fiebre aftosa en la superficie de partículas híbridas de virus.) Modified-live infectious bovine rhinotracheitis virus vaccine expressing monomer and dimer forms of foot-and-mouth disease capsid protein epitopes on surface of hybrid virus particles. *Arch. Virol.*, 120 (1-2): 1-17, 1991. Division of Biochemical Virology, Baylor College of Medicine, Houston, TX 77030, USA.

KIT, S., KIT, M.

(Expresión de proteínas de virus de pseudorrabia y fiebre aftosa por vectores de virus de rinotraqueitis infecciosa bovina.) Expression of pseudorabies virus and foot-and-mouth disease virus proteins by modified-live infectious bovine rhinotracheitis virus vectors. *Proceedings Annual Meeting of the United States Animal Health Association*, 94: 66-75, 1990. In: *Index Vet.*, 60 (7), 1992.

KIT, M., KIT, S., LITTLE, S. P., MARCHI, R. D., MARCHI DI, GALE, C.

(Herpesvirus bovino-1 [virus de rinotraqueitis infecciosa bovina] sirvió de base al vector viral que expresó epítopes de aftovirus.) Bovine herpesvirus-1 (infectious bovine rhinotracheitis virus) based viral vector which expresses foot-and-mouth disease epitopes. *Vaccine*, 9 (8): 564-572, 1991. Div. Biochem. Virol., Baylor Coll. Med., 1 Baylor Plaza, Houston, TX 77030, USA.

KITSON, D. A., BURKE, K. L., PULLEN, L. A. BELSHAM, G. J.

(Poliovirus quiméricos que incluyen secuencias derivadas de dos sitios antigénicos independientes de aftovirus inducen anticuerpos neutralizantes contra el virus aftoso en cobayos.) Chimeric polioviruses that include sequences derived from two independent antigenic sites of foot-and-mouth disease virus (FMDV) induce neutralizing antibodies against FMDV in guinea-pigs. *J. Virol.*, 65 (6): 3068-3075, 1991. AFRC Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory, Ash Road, Pirbright, Woking GU24 ONF, UK.

KITSON, J. D. A., MCCAHERN, D., BELSHAM, G.

(Análisis de secuencia de mutantes resistentes de anticuerpos monoclonales de tipo O de aftovirus: Evidencia de la implicación de las tres superficies expuestas de las proteínas de la cápside en cuatro sitios antigénicos.) Sequence analysis of monoclonal antibody resistant mutants of type O foot and mouth disease virus: Evidence for the involvement of the three surface exposed capsid proteins in four antigenic sites. *Virology*, 179 (1): 26-34, 1990. AFRC Inst. Anim. Health, Pirbright Lab., Pirbright Woking, Surrey GU 24 ONF, UK.

KOROBKO, V. G., BOLDYREVA, E. F., NEKRASOVA, O. V., MIKUL'SKIS, A., DOBRYNIN, V. N. (Síntesis, clonaje y expresión de genes artificiales que codifican para determinantes antigénicos del aftovirus cepa A<sub>22</sub>. Synthesis, cloning and expression of artificial genes coding for antigenic determinants of the foot and mouth disease virus strain A<sub>22</sub>.) Texto en ruso. *Bioorganicheskaya Khimiya*, 17 (4): 461-469, 1991. In: *Vet. Bull.*, 62 (4), 1992. M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow, Russia.

KOSEKI, I., KUBRUSLY, F. S., OLIVEIRA, J. M., NAKAMURA, I. T.

(Efecto de olivacina en la replicación del aftovirus.) Effect of olivacine on foot-and-mouth disease virus replication. *Arquivos do Instituto Biológico (São Paulo)*, 56 (1-2): 79-82, 1989. In: *Index Vet.*, 60 (7), 1992.

KOSEKI, I., SIMONI, I. C., NAKAMURA, I. T., NORONHA, A. B., COSTA, S. S.

(Actividad antiviral de extractos de plantas contra aftovirus, virus de pseudorrabia y pestivirus en cultivos celulares.) Antiviral activity of plant extracts against aphthovirus, pseudorabies virus and pestivirus in cell cultures. *Microbios Letters*, 44 (173): 19-30, 1990. In: *Vet. Bull.*, 62 (10), 1992. Seção de Biologia Celular, Seção de Virologia Fitopatológica e Fisiopatologia, Instituto Biológico, CP-7119, CEP-01051, São Paulo, Brasil.

KREBS, O., BERGER, H. G., MARQUARDT, O.

(Secuencia de proteínas de cápsides que codifican el aftovirus O<sub>2</sub> Brescia.) The capsid protein-encoding sequence of foot-and-mouth disease virus O<sub>2</sub> Brescia. *Arch. Virol.*, 120 (1-2): 135-143, 1991. Bundesforschungsanstalt für Viruskranzheiten der Tiere, Paul-Ehrlich-Strasse 28, PO Box 149, DW-7400 Tübingen, Germany.

KREBS, O., BERGER, H. G., NIEDEBALKI, W., MARQUARDT, O.

(El aftovirus O<sub>1</sub> Lombardía está bioquímicamente relacionado a los aislamientos O<sub>2</sub>.) Foot-and-mouth disease virus O<sub>1</sub> Lombardy is biochemically related to O<sub>2</sub> isolates. *Virus Genes*, 5 (3): 255-265, 1991. In: *Vet. Bull.*, 62 (8), 1992. Federal Research Centre for Virus Diseases of Animals, P.O. Box 1149, D-7400 Tübingen, Germany.

KREBS, O., MARQUARDT, O.

(Identificación y caracterización del aftovirus O1 Burgwedel/1987 como un recombinante intertípico.) Identification and characterization of foot-and-mouth disease virus O1 Burgwedel/1987 as an intertypic recombinant. *J. Gen. Virol.*, 73 (3): 613-619, 1992. Federal Research Centre for Virus Diseases of Animals. PO Box 1149 D-7400 Tübingen, Germany.

- KUZMIN, I. V., RYBAKOV, S. S., IVAN YUSHCHENKOV, V. N., BURDON, A. N.  
(Se determinó la secuencia completa de nucleótidos del ARN del gen de la polimerasa para el aftovirus subtipo A<sub>22</sub>. Complete nucleotide sequence of gene RNA polymerase for the foot-and-mouth disease virus subtype A<sub>22</sub> has been determined.) Texto en ruso. *Bioorg. Khim.*, 15 (3): 419-422, 1989. In: *Viol. Abstr.*, 25 (10), 1992. Res. Inst. Foot-and-Mouth Dis. Virus, Gosagro from, USSR.
- LAOR, O., YADIN, H., CHAI, D., BECKER, Y.  
(Detección del ARN de aftovirus en material de diagnóstico usando el método de reacción en cadena de polimerasa sobre el poli-A genómico del ARN aislado con oligo dT en burbujas magnéticas.) Detection of foot and mouth disease virus RNA in diagnostic material using the PCR method on viral genomic poly-A RNA isolated with oligo dT on magnetic beads. *Israel J. Vet. Med.*, 46 (4): 127-133, 1991. In: *Index Vet.*, 62 (5), 1992. Department of Molecular Virology, Faculty of Medicine, Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem, Israel.
- LEWIS, S. A., MORGAN, D. O., GRUBMAN, M. J.  
(Expresión, procesamiento y ensamble de estructuras de la cápside de aftovirus en sistemas heterólogos: inducción de una respuesta de anticuerpos neutralizantes en cobayos.) Expression, processing, and assembly of foot-and-mouth disease virus capsid structures in heterologous systems: induction of a neutralizing antibody response in guinea pigs. *J. Virol.*, 65 (12): 6572-6580, 1991. Plum Island Animal Disease Center, North Atlantic Area, Agricultural Research Service, U. S. Department of Agriculture, P.O. Box 848, Greenport, NY 11944, USA.
- LIEBERMANN, H. T., DOLLING, R., SCHMIDT, D. *et al.*  
(RGD conteniendo péptidos del VP<sub>1</sub> del aftovirus previenen la infección por virus *in vitro*.) RGD-Containing peptides of VP<sub>1</sub> of foot-and-mouth disease virus (FMDV) prevent virus infection *in vitro*. *Acta. Virol.*, 35 (1): 90-93, 1991. Friedrich - Löffler - Institut, Insel Riems, 2201.
- LIEROP, M. J. C. VAN, MAANEN, K. VAN, MELOEN, R. H., RUTTEN, V.P.M. G., JONG, M. A. C. DE, HENSEN, E. J.  
(Respuestas de linfocitos proliferantes al aftovirus y a tres péptidos de ese virus tras vacunación o inmunización de bovinos con estos péptidos.) Proliferative lymphocyte responses to foot-and-mouth disease virus and three FMDV peptides after vaccination or immunization with these peptides in cattle. *Immunology*, 75 (3): 406-413, 1992. Institute of Infectious Diseases and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Utrecht, PO Box 80.165, 3508 TD Utrecht, Netherlands.
- LUZ, N., BECK, E.  
(Interacción de una proteína celular de 57 kilodaltons con el sitio inicial de traducción interna del aftovirus.) Interaction of a cellular 57-kilodalton protein with the internal translation initiation site of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.*, 65 (12): 6486-6494, 1991. Zentrum für Molekulare Biologie Heidelberg, University of Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 282, D-6900 Heidelberg, Germany.
- MCCULLOUGH, K. C., BRUCKNER, L., SCHAFFNER, R., FRAEFEL, W., MÜLLER, H. K., KIHM, U.  
(Relación entre la reacción de anticuerpos del virus antiaftoso medido por diferentes pruebas, y protección *in vivo* contra infección al desafío.) Relationship between the anti-FMD virus antibody reaction as measured by different assays, and protection *in vivo* against challenge infection. *Vet. Microbiol.*, 30(2-3): 99-112, 1992. Institut für Viruskrankheiten und Immunprophylaxe, Hagenstrasse 74, CH-4025, Basel, Switzerland.

McCULLOUGH, K. C., BUTCHER, R. N.

(Función de redes de idiotipos *in vivo*: inmunización con anticuerpo idiotipo de soporte [1D1] induce más producción de anticuerpo 1D1.) Function of idiotypic networks *in vivo*: immunisation with idio-type-bearing (1D1) antibody induces further production of 1D1 antibody. *FMD Bull.*, 29 (1): 21, 1991.

McCULLOUGH, K. C., PULLEN, L., PARKINSON, D.

(Respuesta inmunitaria contra aftovirus: influencia de los factores de crecimiento IL-1 e IL-2 de linfocitos T sobre la respuesta humoral *in vivo* en murino.) The immune response against foot-and-mouth disease virus: influence of the T lymphocyte growth factors IL-1 and IL-2 on the murine humoral response *in vivo*. *Immunology Letters*, 31 (1): 41-46, 1992. In: *Vet. Bull.*, 62 (8): 1992. Institut für Viruskrankheiten und Immunoprophylaxe, Hagenaustrasse 74, CH-4025 Basel, Switzerland.

McCULLOUGH, K. C., SIMONE, F. DE, BROCCHI, E., CAPUCCI, L., CROWTHER, J. R., KIHM, U.

(Respuesta inmunitaria protectora contra la fiebre aftosa.) Protective immune response against foot-and-mouth disease. *J. Virol.*, 66 (4): 1835-1840, 1992. Institute für Virustrankheiten und Immunoprophylaxe, Hagenaustrasse 74, CH-4025 Basel, Switzerland.

MARQUARDT, O., ADAM, K. H., STRAUB, O. C.

(Detección y localización de diferencias de secuencia de base única en genomas de aftovirus por el método de continuación inadecuada de clivaje de RNasa.) Detection and localization of single-base sequence differences in foot-and-mouth disease virus genomes by the RNase mismatch cleavage method. *J. Virol. Meth.*, 33 (3): 267-282, 1991. Fed. Res. Cent. for Virus Dis. Anim., P. O. Box 1149, D-7400 Tübingen, FRG.

MARTINEZ, M. A., HERNANDEZ, J., PICCONE, M. E., PALMA, E. L., DOMINGO, E., KNOWLES, N., MATEU, M. G.

(Dos mecanismos de diversificación antigénica de aftovirus.) Two mechanisms of antigenic diversification of foot-and-mouth disease virus. *Virology*, 184 (2): 695-706, 1991. Centr. Biol. Mol. CSIC-UAM, Canto Blanco, 28049 Madrid, España.

MEYER, R. F., BROWN, C. C., HOUSE, C., HOUSE, J. A., MOLITOR, T. W.

(Detección rápida y sensible del aftovirus en tejidos por amplificación enzimática del ARN del gen polimerasa.) Rapid and sensitive detection of foot-and-mouth disease virus in tissues by enzymatic RNA amplification of the polymerase gene. *J. Virol. Meth.*, 34 (2): 161-172, 1991. USDA-APHIS, P. O. Box 848, Greenport, NY 11944, USA.

MEYER, R. F., BROWN, C. C., MOLITOR, T. W., VAKHARIA, V. N.

(Uso de hibridación *in situ* para la detección de aftovirus en cultivo celular.) Use of *in situ* hybridization for the detection of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 1 (4): 329-332, 1989. In: *Index Vet.*, 60 (4), 1992.

MIVEV, R. B.

(Situación de la fiebre aftosa en Bulgaria.) Foot and mouth disease status in Bulgaria. *Bull.-OIE*, 104 (1): 39-41, 1992. State Veterinary Service, Sofia, Bulgaria.

MOWAT, G. N.

(Fiebre aftosa en la Comunidad Europea después de 1992 - ¿ el fin o el inicio del problema?) Foot and mouth disease in the (European) Community after 1992 - the end or the beginning of a problem? In: *11th International Symposium of the World Association of Veterinary Microbiologists, Immunologists and Specialists in Infectious Diseases*, Perugia, Mantova, Italy, October 2-6, 1989. In: *Index Vet.*, 60 (3), 1992. Società Editrice Esculapio, 40131 Bologna, Italia.

MUNYUA, S. J. M., NGUHIU-MWANGI, J., NJENGA, J., KARIOKI, D. I.

(Un brote de fiebre aftosa y sus efectos socioeconómicos en una piara de cerdos en Nairobi, Kenia.) An outbreak of foot and mouth disease, and its socio-economic effects, in a herd of pigs in Nairobi, Kenya. *Bulletin of Animal Health and Production in Africa*, 39 (1): 51-55. In: *Index, Vet.*, 60 (8), 1992.

NAYR, S. P., SEN, A. K.

(Estudio comparativo de la respuesta inmunitaria de ovinos a la vacuna antiaftosa virus tipo Asia-1 preparada con diferentes inactivantes y adyuvantes.) A comparative study on the immune response of sheep to foot and mouth disease virus vaccine type Asia-1 prepared with different inactivants and adjuvants. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 15 (2): 117-124, 1992. In: *Vet. Bull.*, 62 (7), 1992. Indian Veterinary Research Institute, Hebbal, 560 024 Bangalore, India.

NASSER AHMAD, BANSAL, S. R., GUPTA, S. L., SHARMA, R. D., RAVINDRA S.

(Supresión de la respuesta inmunitaria en cobayos infectados experimentalmente con *Trypanosoma evansi*.) Suppressed immune response to foot and mouth disease vaccination in guinea pigs experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. *Indian Vet. J.*, 68 (7): 622-626, 1991. In: *Vet. Bull.*, 62 (9), 1992. Department of Veterinary Medicine, College of Veterinary Science, Haryana Agricultural University, Hisar 125 004, India.

NDARATHI, C. M.

(Ovinos y caprinos sin vacunar en Kenia seropositivos a fiebre aftosa.) Unvaccinated sheep and goats in Kenya sero-positive to foot-and-mouth disease. *Indian J. Animal Sci.*, 61 (9): 917-919, 1991. In: *Index Vet.*, 62 (5), 1993. Department of Veterinary Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, P. O. Box 29053, Nairobi, Kenya.

NEBUS, C. A., SINGH, E. L.

(Transferencia de embrión como un medio para controlar infecciones virales. XIII. Falla en la transmisión del aftovirus por la transferencia de embriones de donantes virémicas.) Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. XIII. Failure to transmit FMDV through the transfer of embryos from viremic donors. *Theriogenology*, 35 (2): 435-441, 1991.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES

*Meeting of the FMD and other Epizootics Commission*, Paris 10-13 December 1990. Paris, France, OIE 1990, 106 p. In: *Vet. Bull.*, 62 (9), 1992.

ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD

Erradication de la fiebre aftosa en la subregión amazónica. Situación y estrategia. (Eradication of foot and mouth disease in the Amazonian subregion. Situation and strategy.) *Bol. Of. Sanit. Panam.*, 104 (5): 502-508, 1988.



- PALANISAMY, R., RAMANNA, B. C., ANANDA RAO, K., SRINIVASAN, V. A.  
(Vacunación combinada de bovinos contra fiebre aftosa y rabia.) Combined vaccination of cattle against FMD and rabies. *Microbiologica*, 15 (1): 45-50, 1992. In: *Vet. Bull.*, 62 (11), 1992. Indian Immunologicals, 11-4-657, Lakdi-ka-pul, 500 004 Hyderabad, India.
- PANDEY, A. B., SHARMA, S. K., PATHAK, R. C.  
(Susceptibilidad de mina, gorrión, cucarachas y moscas a la infección experimental por aftovirus tipo Asia-1.) Susceptibility of myna, sparrow, cockroach and houseflies to experimental infection with aphthovirus type 'Asia-1'. *Indian J. Anim. Sci.*, 59 (8): 936-938, 1989. In: *Index Vet.*, 60 (8), 1992. Chandra Shekhar Azal University of Agriculture and Technology, Mathura, Uttar Pradesh 281 001, India.
- PAN AMERICAN FOOT-AND-MOUTH DISEASE CENTER/PAHO  
*Situación de los programas de control de la fiebre aftosa en América del Sur. Situation of the foot-and-mouth disease control programs in South America.* Rio de Janeiro, Brazil, PANAFTOSA/PAHO, 1990. 94 p. In: *Vet. Bull.*, 62 (2), 1992.
- PASTORET, P. P., STROBBE, R., BIENFET, V.  
(Control de la fiebre aftosa en Europa. Foot and mouth disease control in Europe.) Texto en francés. *Ann. Med. Vet.*, 134 (8), 573-574, 1990. In: *Viol. Abst.*, 25 (3), 1992.
- PAVLOV, A. V., RYBAKOV, S. S., IVANYUSHCHENKOV, V. N., CHEPURKIN, A. V., PETROV, V. N., DRYAGALIN, N. N., BURDOV, A. N.  
(Prevención de la enfermedad en animales susceptibles usando polímero lineal de un péptido sintético de aftovirus. Disease prevention in susceptible animals using linear polymer of a synthetic foot and mouth disease virus peptide.) Texto en ruso. *Bioorganicheskaya Khimiya*, 17 (7): 953-963, 1991. In: *Vet. Bull.*, 62 (7), 1992. Vsesoyuznyĭ Nauchno-Issledovatel'skii Yashchurnyĭ Institut, Vladimir, Russia.
- PAY, T. W. F., HINGLEY, P. J.  
(Un método de prueba de potencia para vacuna antiaftosa basado en respuesta de anticuerpos seroneutralizantes producida en bovinos.) A potency test method for foot and mouth disease vaccine based on the serum neutralizing antibody response produced in cattle. *Vaccine*, 10 (10): 707-713, 1992. Claremont Drive, Woking, Surrey GU22 7SQ, UK.
- PFAFF, E., MÜLLER, H., HAAS, B., THIEL, H. J.  
(Análisis molecular e inmunológico de mutantes de aftovirus.) Molecular and immunological analysis of foot-and-mouth disease virus (FMDV) mutants. In: *11th International Symposium of the World Association of Veterinary Microbiologists, Immunologists and Specialists in Infectious Diseases*, In: *Index Vet.*, 60 (3), 1992. Perugia, Mantova, Italy, October 2-6, 1989. Società Editrice Esculapio, 40131 Bologna, Italia.
- PIATTI, P. G., BERINSTEIN, A., LOPEZ, O. J., BORCA, M. V., FERNANDEZ, F., SCHUDEL, A. A., SADIR, A. M.  
(Comparación de la respuesta inmunitaria provocada en ratones por aftovirus infectante e inactivado.) Comparison of the immune response elicited by infectious and inactivated foot-and-mouth disease virus in mice. *J. Gen. Virol.*, 72 (7): 1691-1964, 1991. Plum Island Animal Dis. Cent., USDA, Greenport, NY 11944, USA.

PRASAD, S., SHARMA, R., AHUJA, K. L.

(Especificidad de respuesta inmunitaria por células contra aftovirus en búfalos.) Specificity of cell-mediated immune response against foot-and-mouth disease virus types in buffalo calves. *Indian J. Virol.*, 5 (1-2): 40-44, 1989. In: *Index Vet.*, 60 (1), 1992.

RAO, B. U.

(Desarrollo, producción y aplicación de vacunas para controlar la fiebre aftosa en India.) Development, production, and application of vaccines in foot-and-mouth disease control in India. *Progress in Vaccinology*, 2: 283-296 1989. In: *Index Vet.*, 60 (11), 1992.

RIEDER ROJAS, E., CARRILLO, E., SCHIPPACASSI, M., CAMPOS, R.

(Modificación del aftovirus O<sub>1</sub> Caseros tras pasajes en serie en presencia de sueros policlonales antivirales.) Modification of foot-and-mouth disease virus O<sub>1</sub> Caseros after serial passages in the presence of antiviral polyclonal sera. *J. Virol.*, 66 (6): 3368-3372, 1992. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Junín 956, 1113 Capital Federal, Argentina.

RYAN, M. D., KING, A. M. Q., THOMAS, G. P.

(Clivaje de la proteína del aftovirus es obtenido mediante residuos localizados dentro de la secuencia del aminoácido 19.) Cleavage of foot-and-mouth disease virus polyprotein is mediated by residues located within a 19 amino acid sequence. *J. Gen. Virol.*, 72 (11): 2727-2732, 1991. AFRC Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory, Ash Road, Pirbright, Working, Surrey GU24 0NF, UK.

SAHA, S. N., SEN, A. K.

(Aislamiento del aftovirus tipo A en células BHK-21 C-13 [Glasgow].) Isolation of foot-and-mouth disease virus type "A" plaque variants in BHK-21 C-13 (Glasgow) cells. *Indian J. Anim. Sci.*, 59 (5): 542-545, 1989. In: *Virol. Abstr.*, 25 (2), 1992. Indian Vet. Res. Inst., Bangalore, Karnataka 560 024, India.

SAHA, S. N., SEN, A. K.

(Reemplazo parcial de suero con peptona e hidrolizado de lactalbúmina para la producción de vacuna antiaftosa en células BHK-21.) Partial replacement of serum with peptone and lactalbumin hydrolysate for the production of foot-and-mouth disease vaccine in BHK-21 cells. *Acta Virologica*, 33 (4): 338-343, 1989.

SAINI, S. S., SHARMA, J. K., KWATRA, M. S.

(Evaluación de algunos factores que afectan la prevalencia de la fiebre aftosa entre la población animal tradicionalmente tratada en el estado de Punjab. Intereses socioeconómicos relacionados con la salud animal.) Assessment of some factor affecting the prevalence of foot-and-mouth disease among traditionally managed animal population of Punjab State. Socio-economic and animal health related interests. *Indian J. Anim. Sci.*, 62 (1): 1-4, 1992. In: *Vet. Bull.*, 62 (2), 1992. Punjab Agricultural University, Ludhiana, Punjab 141004, India.

SAIZ, J. C., GONZALEZ, M. J., BORCA, M. V., SOBRINO, F., MOORE, D. M.

(Identificación de sitios antigénicos neutralizantes en VP1 y VP2 del tipo A5 del aftovirus definidos por variantes resistentes a la neutralización.) Identification of neutralizing antigenic sites on VP1 and VP2 of type A5 foot-and-mouth disease virus defined by neutralization resistant variants. *J. Virol.*, 65 (5): 2518-2524, 1991.

**SAMARA, S. I.**

(Medición de anticuerpos contra el aftovirus en suspensión de antígeno crudo y contra el antígeno VIA por la prueba de fijación del complemento cuantitativo en búfalos.) Measurement of antibodies against foot-and-mouth disease virus in a crude antigen suspension and against the VIA antigen by the quantitative complement fixation test in buffaloes. *Rev. Microbiol.*, 23 (1) 17-23, 1992. In: *Viol. Abstr.*, 25 (11), 1992. Dep. Med. Vet. Prev. - Fac. Ciencias Agrarias e Vet. - UNESP 14.870, Jaboticabal, SP, Brasil.

**SAMUEL, A. R., KNOWLES, N. J., SAMUEL, G. D., CROWTHER, J. R.**

(Evaluación de una prueba ELISA de captura para la diferenciación de cepas de aftovirus usando anticuerpos monoclonales.) Evaluation of a trapping ELISA for the differentiation of foot-and-mouth disease virus strains using monoclonal antibodies. *Biologicals*, 19 (4): 299-310, 1991. In: *Index Vet.*, 60 (6), 1992. AFRC Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory, Ash Road, Pirbright, Woking, Surrey GU24 0NF. UK.

**SELLERS, R. F.**

(Fiebre aftosa.) Foot-and-mouth disease. In: Martin, W. B., AITKEN, I. D., Eds. *Diseases of sheep*. Oxford, UK, Blackwell, 1991. p. 219-222. In: *Index. Vet.*, 60 (7), 1992.

**SIGAL, L. J., GOMEZ, G., BRAUN, M.**

(Cambios en células sanguíneas mononucleares periféricas en bovinos afectados por la fiebre aftosa.) Changes in mononuclear peripheral blood cells in cattle with foot-and-mouth disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 30 (4): 431-438, 1992. Univ. Nebraska, Sch. Biol. Sci., 348 Manter Hall, Lincoln, NE 68588-0118, USA.

**SILIGARDI, G., DRAKE, A. F., MASCAGNI, P., ROWLANDS, D. J., BROWN, F., GIBBONS, W. A.**

(La estrategia CD para el estudio de envoltura/desenvoltura de péptido: un péptido sintético inmunogénico de aftovirus.) A CD strategy for the study of polypeptide folding/unfolding: a synthetic foot-and-mouth disease virus immunogenic peptide. *Int. J. Peptide Protein Res.*, 38 (6): 519-527, 1991. In: *Viol. Abstr.*, 25 (8), 1992. Dep. Pharmacol., Chem., 29-39 Brunswick Square, London WC1N 1AX, UK.

**SILIGARDI, G., DRAKE, A. F., MASCAGNI, P., ROWLANDS, D., BROWN, F., GIBBONS, W. A.**

(Correlaciones entre la conformación elucidada por espectroscopia CD y propiedades de cuatro péptidos de aftovirus.) Correlations between the conformation elucidated by CD spectroscopy and the antigenic properties of four peptides of the foot-and-mouth disease virus. *Eur. J. Biochem.*, 199 (3): 545-551, 1991. In: *Viol. Abstr.*, 25 (8), 1992. Dep. Chem., Birkbeck Coll., 20 Gordon St., London WC1H 0AJ, UK.

**SKINNER, H. H.**

(El viaje de estudio de 1937 a Alemania de estudiantes del Real Colegio de Veterinaria, Londres. Introducción personal sobre investigación en fiebre aftosa.) The 1937 study tour in Germany by students of the Royal Veterinary College, London. A personal introduction to foot and mouth disease research. *Vet. Hist.*, 7 (1): 15-18, 1992. In: *Index Vet.*, 60 (10), 1992.

- STEWART, K. W., STANLEY, C. M., DIMARCHI, R., MULCAHY, G., DOEL, T. R.  
 (La alta afinidad de anticuerpo inducida por inmunización con péptido sintético está asociada con la protección de bovinos contra la fiebre aftosa.) High-affinity antibody induced by immunization with synthetic peptide is associated with protection of cattle against foot-and-mouth disease. *Immunol.*, 72 (1): 99-103, 1991.
- STRATING, A.  
 (Parecer de los Estados Unidos sobre el control de la fiebre aftosa.) The United States view on the control of foot and mouth disease. In: *11th International Symposium of the World Association of Veterinary Microbiologists, Immunologists and Specialists in Infectious Diseases*, Perugia, Mantova, Italy, October 2-6, 1989. In: *Index Vet.*, 60 (3), 1992. Società Editrice Esculapio, 40131 Bologna, Italia.
- STROBBE, R.  
 Consecuencias de la suspensión de la vacunación antiaftosa en la Comunidad Económica Europea. (Consequences of the suspension of foot-and-mouth disease vaccination in the European Economic Community.) *Rev. Med. Vet. (Buenos Aires)*, 73 (2): 78-81, 1992. In: *Index Vet.*, 60 (11), 1992.
- SURYANARAYANA, V. V. S., VENKATARAMANAN, R., RAO, B. U., PADAYATTY, J. D.  
 (Caracterización y respuesta inmunitaria de una proteína producida por un clon de ADNc de aftovirus tipo Asia 1 63/72.) Characterization and immune response of a protein produced by a cDNA clone of foot and mouth disease virus, type Asia 1 63/72. *Biochemistry International*, 26 (6): 1003-1016, 1992. In: *Vet. Bull.*, 62 (9), 1992. Institute, Bangalore 560024, India.
- TERPSTRA, C., MAANEN, C. VAN  
 (Protección y transmisión de virus en bovinos de Holanda tras desafío por vía intranasal con cepas de aftovirus homólogo y heterólogo 1-3 años después de tres vacunaciones anuales consecutivas.) Protection and virus transmission of Dutch cattle following intranasal challenge with homologous and heterologous FMD virus strains 1-3 years after three consecutive annual vaccinations. In: *11th International Symposium of the World Association of Veterinary Microbiologists, Immunologists and Specialists in Infectious Diseases*, Perugia, Mantova, Italy, October 2-6, 1989. In: *Index Vet.*, 60 (3), 1992. Società Editrice Esculapio, 40131 Bologna, Italia.
- THÉODORIDÉS, J.  
 (Consideraciones históricas sobre fiebre aftosa. Historical considerations on foot and mouth disease.) Texto en francés. *Bulletin Mensuel de la Société Vétérinaire Pratique de France*, 76 (3): 157-172, 1992. In: *Index Vet.*, 60 (8), 1992.
- VALCIC, M., PANJEVIC, D.  
 (Unión aumentada de anticuerpos moleculares al aftovirus usando un segundo anticuerpo molecular. Enhanced binding of monoclonal antibodies to aphthovirus by using a second monoclonal antibody.) Texto en ruso. *Veterinary Glasnik*, 44 (1): 79-82, 1990. In: *Vet. Bull.*, 62 (4), 1992. Veterinarski Fakultet, Universitet, Beograd, Yugoslavia.

VALCIC, M. A., PNAJEVIC, D. J.

(Aftovirus subtipo C3 Resende analizado por RIA de competición usando anticuerpos monoclonales neutralizantes.) Foot-and-mouth disease virus C3 Resende subtype analysed by means of competition RIA using neutralizing monoclonal antibodies. *J. Vet. Med. Series B*, 39 (3): 193-200, 1992. In: *Vet. Bull.*, 62 (10), 1992. Department of Infectious Diseases of Animals and Bees, Veterinary Faculty, University of Belgrade, Bul. JNA 18, 11000 Belgrad, Yugoslavia.

VALCIC, M. A., PANJEVIC, D. J.

(Mapeo de epitopes del antígeno del aftovirus serotipo C Resende por el método de anticuerpos monoclonales e inmunoradiensayo de competición. Mapping the antigen epitopes of foot and mouth disease virus serotype C Resende by the monoclonal antibody method and competitive radioimmunoassay.) Texto en servio-croata. *Veterinarski Glasnik*, 45 (3-4): 197-206, 1991. In: *Index Vet.*, 62 (5), 1992. Veterinarski Fakultet, Univerzitet, Belgrade, Yugoslavia.

VASANTHA, S., VENKATARAMANAN, R., PATTNAIK, B., RAL, D. V., SHARMA, B.

(Producción de anticuerpos anti-146 S contra cepas de aftovirus originarias de India.) Production of anti-146 "S" antibodies against foot-and-mouth-disease virus strains of Indian origin. *Indian J. Anim. Sci.*, 59 (8): 909-912, 1989. In: *Virol. Abst.*, 25 (7), 1992. Natl. Inst. Health, Bethesda, MD 20892, USA.

VIDAL, M., CAIRÓ, J., MATEU, M. G., VILLAVERDE, A.

(Clonaje molecular y expresión del VP1 del gen del aftovirus C<sub>1</sub> en *E. coli*: efecto sobre viabilidad de células bacteriales.) Molecular cloning and expression of the VP1 gene of foot-and-mouth disease virus C<sub>1</sub> in *E. coli*: effect on bacterial cell viability. *Appl. Microbiol. Biotechn.*, 35 (6): 788-792, 1991. In: *Vet. Bull.*, 62 (1), 1992. Institut de Biologia Fonamental i Departament de Genètica i Biologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, 08193 Barcelona, España.

WOODHAM, C. B.

(Fiebre aftosa en América Latina.) Foot-and-mouth disease in Latin America. *Foreign Anim. Dis. Rep.*, 20 (1), 1992. In: *Index Vet.*, 60 (10), 1992.

WU, S. Y., YANG, C. Y., CHEN, S. K., SHEN, Z. D., WANG, X. Z.

(Detección de aftovirus con sondas de ADNc marcadas con fotobiotin.) Detection of foot and mouth disease virus with photobiotin-labelled cDNA probes. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 22 (4): 365-360, 1991. In: *Vet. Bull.*, 62 (12), 1992. National Animal Quarantine Institute, Agricultural Ministry, Tsingdao, China.

ZEMIJC, B.

(Tratamiento y prevención de enfermedades en patas de vacas lecheras en producción intensiva de leche. Treatment and prevention of hoof diseases in dairy cows in intensive milk production.) Texto en esloveno. *Zbornik Veterinarske Fakultete Univerza Ljubljana*, 28 (2): 177-198, 1991. In: *Index Vet.*, 60 (13), 1992.

## BOLETIN DEL CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA

### INVITACION A LOS AUTORES

El BOLETIN del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa es una revista 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 de papel, tamaño carta (28 x 22cm).
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. Vicente Astudillo, Director  
 Dr. Albino Alonso Fernández, Servicios de Laboratorio  
 Dr. Ubiratan Mendes Serrão, Servicios de Campo  
 Dr. Víctor M. Varela-Díaz, Adiestramiento e Información

## PAN-AMERICAN FOOT-AND-MOUTH DISEASE CENTER BULLETIN

### INVITATION TO CONTRIBUTORS

The BOLETIN is a 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 service 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 or articles published. In special cases, extra reprints may be arranged.

#### EDITORIAL COMMITTEE

Dr. Vicente Astudillo, Director  
Dr. Albino Alonso Fernández, Laboratory Services  
Dr. Ubiratan Mendes Serrão, Field Services  
Dr. Víctor M. Varela-Díaz, Training and Information