

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

R. ALLENDE¹, L.M. SEPULVEDA¹, A. ALONSO¹, F.B. RANGEL FILHO²

¹Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS)

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

²Universidade 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 GI): La glicoproteína se preparó conforme procedimiento ya descrito (3), a partir de suspensiones del AgVN. El AgGI 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 intradermoplantar 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 µl/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 µl/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 µl/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 µl/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 µl/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 µl/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 µl/cavidad de H₂SO₄ 3N al sustrato que estaba en la placa.

Sueros:	Nº 1	Nº 2	Nº 3	Nº 4	Nº 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.

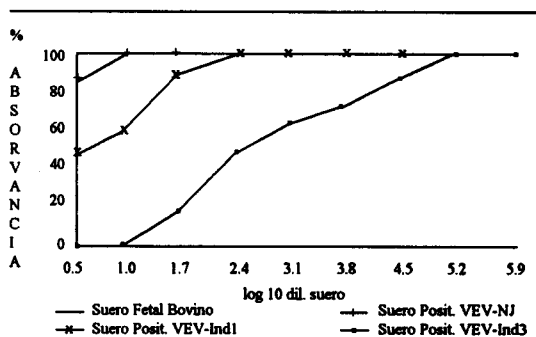


FIGURA 2. Representación gráfica de los títulos de ELISA de los sueros de referencia frente al antígeno glicoproteína VEV Indiana-3 Br/86.

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

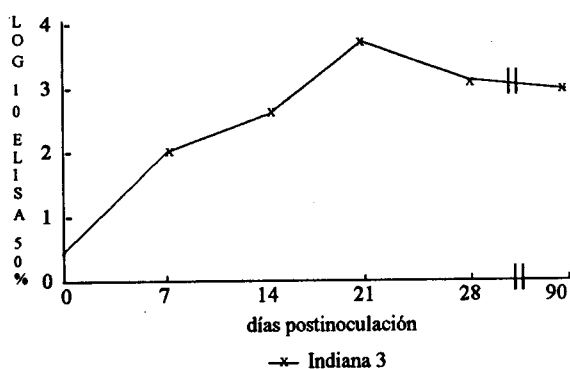


FIGURA 3. Representación gráfica de los títulos de ELISA en los sueros de referencia de cobayos inoculados con VEV Indiana-3 Br/86, estudiados frente al antígeno de glicoproteína de VEV Indiana-3 Br/86.

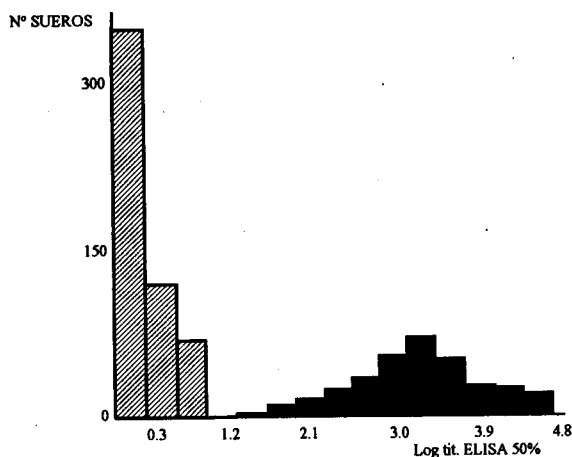


FIGURA 4. Representación gráfica de los resultados de las titulaciones por ELISA de los sueros de regiones libres (▨) y de actividad viral del VEV Indiana-3 (●).

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

Región	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				
Suero		A	B	C	D	E
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
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
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		Gl	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

- ALONSO, A. *Manual de diagnóstico de laboratorio de las enfermedades vesiculares*. Rio de Janeiro, PANAFOTSA, 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 estomatite vesicular por técnica de virusneutralización. *Inf. Epid. Mensual PANAFOTSA*, 11 (5): 58-60, 1979.
- GARCIA PIRAZZI, A.J., CAGGIANO, C.H., ALONSO, A. Estomatite 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.

16. MARKUS, R. *Elementos de estatística 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. PANAFTOSA. 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