

ISSN 0009-0131

BOLETIN

del
centro panamericano
de
fiebre aftosa

59



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 59, enero-diciembre 1993
Nº 59, January-December 1993

Contenido Contents

La importancia de PANAFTOSA en los programas de investigación y desarrollo para el control y erradicación de la fiebre aftosa en las Américas.....	3
The relevance of the research and development programs of PANAFTOSA to the control and eradication of foot-and-mouth disease in the Americas.....	10
<i>V. Astudillo, T.R. Doel, V.M. Varela-Díaz</i>	
Aspectos intersectoriales e interdisciplinarios en los sistemas de atención veterinaria local.....	17
Intersectoral and interdisciplinary aspects in the local veterinary attention systems.....	23
<i>V. Astudillo, A. Zottele</i>	
Los circuitos de comercialización bovina como elementos de intervención sanitaria.....	29
The bovine commercialization circuits as elements of sanitary intervention.....	37
<i>G.M. de Moraes</i>	
La producción familiar y las estrategias de salud animal.....	45
Family production and animal-health strategies.....	55
<i>A. Zottele, H. Tamayo, S. Brieva, L. Iriarte</i>	
Análisis epidemiológico y atención veterinaria en salud animal.....	65
Epidemiological analysis and animal-health veterinary attention.....	71
<i>V. Astudillo, A. Zottele, F. Dora</i>	
Producción y caracterización de anticuerpos monoclonales contra la fiebre aftosa.....	77
Production and characterization of monoclonal antibodies against foot-and-mouth disease virus.....	85
<i>J.L. da Silva, M.M. Kanashiro, D.L. Brum</i>	

Caracterización detallada de algunos anticuerpos monoclonales que reconocen sitios antigénicos en el VP ₁ del virus de la fiebre aftosa.....	93
Detailed characterization of some monoclonal antibodies which recognize antigenic sites on VP ₁ of foot-and-mouth disease virus.....	102
<i>T.R. Doel, M.M. Kanashiro, J.L. da Silva</i>	
Medición de niveles de antibióticos en vacunas oleosas antiaftosa por métodos químicos.....	111
Measurement of antibiotic levels in foot-and-mouth disease oil vaccines by chemical methods.....	118
<i>J. Torroba, V.M. Varela-Díaz, E.C. Vivino, J.A. Mesquita</i>	
Determinación de pirógenos en vacunas antiaftosa oleosas.....	125
Determination of pyrogens in oil adjuvant vaccines against foot-and-mouth disease...	128
<i>P.M. Cottas, V.M. Varela-Díaz, H.S. Paim, J.A. Mesquita</i>	
Detección de secuencias genómicas del virus de la fiebre aftosa mediante la hibridación de ácidos nucleicos: un enfoque para el diagnóstico de infección persistente.....	131
Detection of foot-and-mouth disease viral genomic sequences by nucleic acid hybridization: an approach to the diagnosis of persistent infection.....	136
<i>I.E. Bergmann, V. Malirat, P. Augé de Mello, I. Gomes</i>	
Caracterización serológica y molecular de cepas del virus de la fiebre aftosa, serotipo O, aisladas a partir de brotes ocurridos entre 1958 y 1983 en Brasil y Argentina.....	141
Serological and molecular characterization of foot-and-mouth disease, serotype O viruses isolated from outbreaks in Brazil and Argentina between 1958 and 1983.....	147
<i>V. Malirat, I.E. Bergmann, A. Alonso, P.J.V. Pereira, M.A.A. Boller</i>	
Enfoques moleculares para el diagnóstico en laboratorio de la infección persistente con el virus de la fiebre aftosa.....	153
Molecular approaches to laboratory diagnosis of persistent foot-and-mouth disease virus infection.....	166
<i>I.E. Bergmann, V. Malirat</i>	
Publicaciones de PANAFTOSA - PANAFTOSA publications.....	178
Resúmenes - Abstracts.....	181
Bibliografía sobre enfermedades vesiculares - Bibliography on vesicular diseases.....	196

Reconocimientos

El Comité Editorial agradece a los doctores S. Ucerlay, Emilio A. Coltorti, Esteban Domingos, Anibal Zottele, Hugo Tamayo, Narey Cotrina, Victor Saraiva y Francisco Salazar por su colaboración en la revisión de los manuscritos.

LA IMPORTANCIA DE PANAFTOSA EN LOS PROGRAMAS DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO PARA EL CONTROL Y ERRADICACIÓN DE LA FIEBRE AFTOSA EN LAS AMÉRICAS

V. ASTUDILLO, T.R. DOEL, V.M. VARELA-DÍAZ

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS)

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

RESUMEN. La contribución del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa para el conocimiento de las enfermedades vesiculares de los animales, especialmente la fiebre aftosa, ha sido de gran trascendencia para los programas de control iniciados durante las últimas cuatro décadas. En esta revisión se examina la importancia de la investigación en el pasado y los enfoques futuros para la investigación y el desarrollo sobre el control y erradicación de la enfermedad de las Américas.

El Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (PANAFTOSA), ubicado en Rio de Janeiro, Brasil, forma parte de la Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS). Desde su creación en 1951 por la Organización de los Estados Americanos, con el apoyo de la Oficina Sanitaria Panamericana y del Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, el Centro ha hecho importantes contribuciones para el control de la fiebre aftosa en América Latina a través de numerosas actividades. Entre ellas se incluye el rol del Laboratorio de Referencia para Enfermedades Vesiculares para las Américas, el apoyo en cooperación técnica y coordinación de programas nacionales e internacionales dirigidos a la prevención, control y erradicación de la fiebre aftosa en América Latina, la producción de vacuna antiaftosa, la investigación y desarrollo. En 1968, PANAFTOSA pasó a ser administrado por la OPS.

En 1958, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y el Laboratorio Mundial de Referencia (WRL), en Pirbright, Reino Unido, reconocieron oficialmente a PANAFTOSA como organismo coordinador para las campañas antiaftosa en América del Sur y como canal de comunicación entre los países y el WRL. La Oficina Internacional de Epizootias, en su Sesión General XXVIII, aceptó este estado.

En 1969, los Ministros de Agricultura de la región, por la Resolución X de la II Reunión Interamericana a Nivel Ministerial sobre Fiebre Aftosa y Otras Zoonosis (RICAZ) realizada en Brasil, reconocieron a PANAFTOSA como el Laboratorio de Referencia para las Américas para el diagnóstico de la fiebre aftosa (42), y en 1979, por la Resolución V de la RICAZ XII, en Curaçao, reconocieron PANAFTOSA como Laboratorio Regional de Referencia para el control de calidad de las vacunas antiaftosa (43). En 1992, la XIX Reunión Ordinaria de la Comisión Sudamericana para la Lucha contra la Fiebre Aftosa (COSALFA), en Argentina, en su Resolución V

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

indicó PANAFTOSA como el Laboratorio de Referencia para la región para la vigilancia epidemiológica de las enfermedades vesiculares (45).

DIRECCIÓN POLÍTICA Y TÉCNICA

En las Américas hay tres foros que son esenciales para el establecimiento de directivas políticas y técnicas para los programas de prevención, control y erradicación en el hemisferio:

1. La Reunión Interamericana de Salud Animal a Nivel Ministerial (RIMSA, conocida como RICAZ hasta 1979), que se realiza cada dos años para discutir las políticas de salud animal en la región. Típicamente (41), estas reuniones operan con los antecedentes de documentos de trabajo provistos por la OPS y las resoluciones de reuniones como COSALFA y COHEFA (ver abajo), y culminan en resoluciones emanadas por los representantes de los países miembros. Como consecuencia, las solicitudes y recomendaciones deben dirigirse a la OPS o a los países miembros para implementar o cursar una acción. La RIMSA además analiza los programas y presupuestos de los Centros de la OPS para los próximos dos años y hace recomendaciones al Director de la OPS para sus futuras actividades.
2. El Comité Hemisférico para la Erradicación de la Fiebre Aftosa (COHEFA) está formado por representantes de los sectores público (Ministros de Agricultura) y privado (productores) de seis regiones de las Américas. Se reúne cada dos años en la misma época que las RIMSA y trata, principalmente, de los aspectos técnicos de los programas de prevención, control y erradicación de la fiebre aftosa (44) en las Américas y, además, prevé el financiamiento del Plan Hemisférico para la Erradicación de la Fiebre Aftosa. Las resoluciones del COHEFA son presentadas en la RIMSA para su discusión y recomendación a los países miembros, COSALFA u OPS, según sea apropiado.
3. La COSALFA, formada para los directores de salud animal de los países de América del Sur, se reúne anualmente y actúa como un cuerpo consultivo para el Director del Centro, que es su Secretario ex officio. Los objetivos de la COSALFA son promover, coordinar y evaluar los programas nacionales, los proyectos subregionales y los

acuerdos fronterizos sobre la fiebre aftosa en los países de la región (26).

Los proyectos de investigación y las actividades técnicas del Centro son, además, evaluadas por un Comité Científico Asesor ad hoc formado por científicos de renombre internacional que someten sus conclusiones y recomendaciones al Director de la OPS.

BASES OPERACIONALES DE PANAFTOSA

Los trabajos realizados por PANAFTOSA se dividen en dos áreas. La primera, Servicios de Campo, interactúa directamente con los países miembros y proporciona apoyo de varias maneras, incluyendo la operación del sistema continental de vigilancia de las enfermedades vesiculares, consulta y servicios de asesoría y asistencia técnica sobre diferentes aspectos de los programas de control y adiestramiento e información.

La segunda, Servicios de Laboratorio, abarca investigación, desarrollo y servicios técnicos. A su vez, esta área es apoyada por servicios de mantenimiento esenciales, como los provistos por grupos de pequeños y grandes animales de experimentación, y por el laboratorio de cultivo de tejidos. En determinados aspectos, estos servicios de laboratorio no se encuentran al alcance directo de los usuarios, o sea, las autoridades veterinarias de los países miembros, pero esto no minimiza la importancia de este trabajo. La sección siguiente, en la cual los avances científicos del Centro son examinados, muestra el importante papel que la investigación y el desarrollo han desempeñado en el diagnóstico y el control de la fiebre aftosa en las Américas.

PROGRESOS Y ACTIVIDADES FUTURAS DE LOS SERVICIOS DE LABORATORIO

El personal de los laboratorios de investigación de PANAFTOSA ha contribuido para nuestro conocimiento con una amplia variedad de tópicos sobre enfermedades vesiculares de los animales, con especial referencia al diagnóstico y control de la fiebre aftosa. El Centro publicó recientemente

un catálogo de publicaciones de 1952 a 1993 con un resumen de las actividades científicas de PANAFTOSA durante cuatro décadas (25). A través de la estrecha interacción y colaboración entre los laboratorios de diagnóstico y producción de vacuna, varios de los progresos obtenidos en las investigaciones han sido transferidos efectivamente a aplicaciones prácticas.

Como se mencionó, PANAFTOSA tiene el papel de Laboratorio de Referencia para las Américas y, por lo tanto, una de sus funciones principales es analizar muestras enviadas por los países miembros. Estas muestras pueden ser de sueros para uso en pruebas de anticuerpos o muestras de tejidos/fluidos vesiculares para pruebas de detección de virus. Solo en la última década, el laboratorio de diagnóstico examinó 38.582 muestras, y claramente desempeña un importante papel en el servicio de vigilancia de enfermedades vesiculares realizado en el Centro. Debido a la necesidad de un conocimiento adecuado de las cepas de fiebre aftosa actuantes en el campo y a su relación con las cepas vacunales, los investigadores en este sector han realizado activos estudios sobre la caracterización serológica de cepas de fiebre aftosa actuantes en América Latina, usando varias técnicas (6,8,21,28,34). Desde mediados de la década de los ochenta, se realizaron estudios básicos de caracterización suplementados por técnicas de biología molecular, incluyendo mapeo de oligonucleotídeos y secuenciamiento del ácido nucleico (21,23), así como una aplicación seleccionada de anticuerpos monoclonales desarrollados contra las cepas principales de fiebre aftosa (11). Se puede anticipar que la elevada definición a ser alcanzada con las técnicas serológicas y de biología molecular más modernas harán que en el futuro el diagnóstico de rutina sea más fidedigno que actualmente. Además, se espera que la investigación adicional sobre epidemiología molecular jugará un papel más importante cuando el número de brotes de fiebre aftosa sea reducido por la efectiva implementación de los programas de control.

La investigación sobre vacunas antiaftosa siempre ha sido primordial en las actividades de PANAFTOSA (40). Los primeros estudios sobre la

susceptibilidad de diferentes células fueron seguidos por la adopción y explotación de la producción de virus por el método de Frenkel y células BHK-21 (4,38,39). Durante este período, también se realizaron extensos estudios con formas atenuadas de virus debido al considerable éxito obtenido con otras vacunas de virus atenuado (35). Sin embargo, los numerosos problemas asociados al uso de vacunas antiaftosa atenuadas llevaron al desarrollo y uso exclusivo de formulaciones inactivadas. Sobre esto, el Centro estuvo al frente y realizó invalorable contribuciones en las áreas de cinética de inactivación y adyuvantes. Las deficiencias de la inactivación con formaldehído fueron rápidamente reconocidas y el problema para obtener el inactivante preferido, la acetiltileneimina, estimuló la evaluación de alternativas considerando el uso de la etileneimina binaria (BEI) como el más exitoso (18,19). La BEI es un inactivante muy eficaz siempre que sea usado correctamente y se desarrolló un procedimiento colorimétrico para examinar la síntesis del reaccionante poco después de su uso a nivel industrial. Actualmente, la BEI se utiliza en todo el mundo, casi que exclusivamente, en la producción de vacunas antiaftosa. El Centro también es conocido por su trabajo pionero sobre adyuvantes para vacunas antiaftosa, especialmente las preparaciones oleosas (1,2,3,5,14,15,16,17,32,33,36,40). Numerosas publicaciones sobre calidad y duración de inmunidad en bovinos vacunados con diferentes preparaciones culminaron en la producción, en PANAFTOSA, de vacunas antiaftosa con adyuvante oleoso debido a su superioridad sobre las formulaciones de hidróxido de aluminio/saponina clásicas. Por estas razones, este tipo de vacuna también ha recibido mayor aceptación mundial. Además, las vacunas oleosas han sido utilizadas en cerdos. La justificativa para la investigación sobre el desarrollo de esta vacuna es simple. Las vacunas contra la fiebre aftosa, especialmente las formulaciones de hidróxido de aluminio/saponina, tenían que ser aplicadas regularmente para alcanzar niveles elevados y durables de inmunidad en un rebaño. Consideraciones económicas y logísticas hicieron que el desarrollo de vacunas antiaftosa fuese una alta prioridad y, en ese sentido, el Centro mantendrá su

cometido en esta área sobre estudios de adyuvantes y sistemas de envío, y realizando investigaciones sobre vacunas recombinantes. Estas últimas tienen la ventaja considerable de que están libres de contaminación potencial con virus vivo, un problema especialmente identificado en Europa luego de la reducción de brotes de la enfermedad debido a carne y ganado contaminados (20).

El Centro, junto con otros laboratorios de fiebre aftosa, se encuentra en proceso de establecer una reserva significativa (banco) de antígenos de fiebre aftosa concentrados e inactivados que son almacenados a temperaturas muy bajas. Estos antígenos serán reservados para la formulación de vacuna para atender situaciones de emergencia, cuando no se disponga de suministros convencionales. Por lo tanto, estos bancos de antígenos son especialmente importantes para el plan hemisférico de erradicación de la fiebre aftosa debido a la generación de extensas áreas libres de la enfermedad y la correspondiente pérdida de incentivo para el comercio y los laboratorios oficiales para continuar la producción de vacuna antiaftosa.

Las pruebas de potencia y seguridad de vacunas realizadas tanto por el Centro como en otras unidades de producción han sido una importante área de trabajo. La prueba de seroprotección ha sido realizada como una alternativa más económica para las pruebas de desafío de virus vivo en bovinos. Estudios similares han examinado otros enfoques que incluyen cantidad de anticuerpos seroneutralizantes y su correlación con la potencia en bovinos (9,12,13,27,29,31,48,49). Sobre esto, el Centro tiene una importante ventaja sobre otros laboratorios de fiebre aftosa debido al gran número de sueros y cantidad de datos de potencia de bovinos disponibles a través de su papel en América Latina. La seguridad de las vacunas antiaftosa, especialmente sobre las respuestas alérgicas en bovinos, también ha formado la base de estudios realizados por el personal del Centro (24).

Una preocupación continua entre las autoridades de salud animal en el mundo es la persistencia de la fiebre aftosa en bovinos después de recuperados de la infección o desafío de campo de ganado vacunado, y numerosos estudios en el

Centro y en otras instituciones (30,46,47) han respondido estas cuestiones. De hecho, hay poca evidencia de transmisión de animales "portadores" a bovinos totalmente susceptibles a pesar de considerables esfuerzos para demostrar esto experimentalmente. Sin embargo, las autoridades de salud animal percibieron el riesgo limitado, y la detección de persistencia en bovinos permanece un importante desafío. Esto se ha realizado clásicamente, y continuará a realizarse en el futuro previsible por el cultivo de fluidos de probang con células susceptibles.

En PANAF-TOSA se han llevado a cabo otros enfoques para aumentar las pruebas de infectividad, incluyendo la medición de títulos de anticuerpos contra una de las proteínas no estructurales del virus, el denominado antígeno VIA (7,10). Esta prueba da algunas evidencias de si un animal ha sido vacunado y/o infectado. Sin embargo, como todas las técnicas serológicas, la prueba VIA tiene sus limitaciones y es solo una de las diversas pruebas realizadas en el Centro para alcanzar el estado inmunitario de un animal. Una nueva prueba actualmente en estudio examina los niveles de anticuerpos contra todas las proteínas no estructurales del virus (22,37). Las proteínas individuales, que son purificadas de bacterias recombinantes, son ensayadas por electroforesis en geles de poliacrilamida y luego marcadas en tiras de nitrocelulosa. A seguir, las tiras son embebidas en un pequeño volumen de sueros bovinos, seguido por anticuerpos antiespecies y las bandas teñidas positivamente son detectadas por conjugados ELISA clásicos y substratos. Debido al objetivo global de erradicar la fiebre aftosa del hemisferio por una combinación de vacunación y medidas zoonosanitarias, esta área asumirá cada vez más importancia para discriminar entre ganado infectado por virus y libre de virus. La aceptación internacional de estas pruebas tendrá profundas implicaciones para la exportación de carcasas y ganado en América Latina.

CONCLUSIONES

Esta breve revisión del rol de los Servicios de Laboratorio de PANAF-TOSA no tiene la intención

de ser didáctica, sino que destaca las contribuciones pasadas y presentes del Centro a la investigación en el esquema global para controlar y erradicar la fiebre aftosa en las Américas. Para el futuro, se espera que el programa de investigación del Centro sea altamente flexible y dinámico para alcanzar las necesidades de los Servicios de Campo de PANAFTOSA, así como las de los países afectados por la enfermedad. Las diferentes situaciones epidemiológicas que ocurrirán, como consecuencia de la erradicación progresiva de esta enfermedad altamente contagiosa, crearán nuevas preguntas y servirán de estímulo para nuevos enfoques en el diagnóstico y el control. El rol de los Servicios de Laboratorio de PANAFTOSA será decisivo para la erradicación de la fiebre aftosa y el mantenimiento del estado de libre de la enfermedad.

REFERENCIAS

1. CHARLES, E.G., DURINI, L.A., FRICK, E., DEGIORGI DE BURGHI, E., RADISICH, T. Vida útil de una vacuna antiaftosa inactivada con adyuvante oleoso./Shelf life of inactivated oil-adjuvanted foot-and-mouth disease vaccine. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 37-38: 17-24, 1980.
2. ABARACÓN, D., MESQUITA, J.A., SALLÚA, S., PÉREZ RAMA, R. Emulsificante Montanide 888 para la preparación de vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso./Montanide 888 emulsifying agent for preparation of oil-adjuvanted foot-and-mouth disease vaccine. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 45-46: 51-57, 1982.
3. ABARACÓN, D., MESQUITA, J.A., GIACOMETTI, H., SALLÚA, S., PÉREZ RAMA, R. Preparación de vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso usando antígenos adsorbidos sobre hidróxido de aluminio./Formulation of oil-adjuvanted foot-and-mouth disease vaccines containing antigen adsorbed to aluminum hydroxide. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 45-46: 43-50, 1982.
4. ABREU MARTINS, I. Producción económica de virus aftoso para fabricación de vacunas por el método Frenkel. *Cienc. Vet., México*, 5 (6): 489-496, 1960.
5. ABREU MARTINS, I. Vacunas antiaftosas hidróxido-saponinadas inactivadas por el formol. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 1: 1-19, 1971.
6. ALONSO, A. Types and subtypes of foot-and-mouth disease virus currently found in South America. *Br. Vet. J.*, 134: 53-57, 1978.
7. ALONSO, A., AUGÉ DE MELLO, P., GOMES, I., ROSENBERG, F.J. El uso del antígeno asociado a la infección viral (VIA) en la detección de ganado expuesto al virus de la fiebre aftosa./The use of virus-infection-associated antigen (VIA) in the detection of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus. (Brief report). *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 17-18: 17-22, 1975.
8. ALONSO, A., AUGÉ DE MELLO, P., ROSENBERG, F.J. Serological and immunological relationship of FMD viruses type C in South America. In: *FAO. Rep. Res. Gp. Stand. Techn. Com. Eur. Comm. Control FMD*. Brescia/Padua, Italy, 23-26 September 1975. p. 138-147.
9. ALONSO, A., CASAS OLASCOAGA, R., BAHNEMANN, H.G., ASTUDILLO, V., SÖNDAHL, M.S., GOMES, I., BALTAR, J., FERNÁNDEZ, G. Producción y control de calidad de la vacuna antiaftosa en América del Sur./ Production and quality control of foot-and-mouth disease vaccines in South America. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 51: 3-22, 1985.
10. ALONSO, A., GOMES, M.P.D., MARTINS, M.A., SÖNDAHL, M.S. Detection of foot-and-mouth disease virus infection-associated antigens antibodies: comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay and agar gel immunodiffusion tests. *Prev. Vet. Med.*, 9: 233-240, 1990.
11. ALONSO, A., GOMES, M.P.D., RAMALHO, A.K., ALLENDE, R., BARAHONA, H., SÖNDAHL, M.S., OSORIO, F.A. Characterization of foot-and-mouth disease virus by monoclonal antibodies. *Viral Immunology*, 6 (3): 210-228, 1993.
12. ALONSO, A., GOMES, I., VIEIRA, A. Control de vacunas antiaftosas. Relación entre el índice K (modificado) y los índices de seroprotección y seroneutralización. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 6: 1-16, 1971.
13. ASTUDILLO, V., GOMES, I., WANDERLEY, M. Precisión de la prueba de seroprotección en la evaluación del nivel de anticuerpos de fiebre aftosa./ Precision of the mouse protection test in evaluating foot-and-mouth disease antibody levels. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 23-24: 25-31, 1976.
14. 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./Field application of inactivated oil

- adjuvanted foot-and-mouth disease virus vaccine: vaccination and revaccination of young cattle. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 19-20: 31-47, 1975.
15. AUGÉ DE MELLO, P., ASTUDILLO, V., GOMES, I., CAMPOS GARCÍA, J.T. Respuesta inmunitaria de bovinos adultos vacunados contra la fiebre aftosa con vacuna oleosa./Immune response of adult cattle vaccinated with oil adjuvanted foot-and-mouth disease vaccines. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 26: 23-29, 1977.
 16. AUGÉ DE MELLO, P. GOMES, I. Respuesta anamnésica en bovinos a la revacunación con vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso./Anamnestic response in cattle after revaccination with oil adjuvanted foot-and-mouth disease vaccines. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 27-28: 49-60, 1977.
 17. AUGÉ DE MELLO, P., GOMES, I. Vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso para cerdos. I. Vacuna de emulsión doble aplicada por diferentes vías./Foot-and-mouth disease oil adjuvanted vaccines for pigs. I. Double emulsion vaccine applied by different routes. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 31-32: 1-12, 1978.
 18. BAHNEMANN, H.G. Empleo de la etileneimina y la propileneimina como agentes inactivantes del virus de la fiebre aftosa./The inactivation of foot-and-mouth disease virus by ethylenimine and propylenimine. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 7: 41, 1972.
 19. BAHNEMANN, H.G., AUGÉ DE MELLO, P., ABARACÓN, D., GOMES, I. Immunogenicity in cattle of foot-and-mouth disease vaccines inactivated with binary ethylenimine. *Bull. Off. Int. Epizoot.*, 81 (11-12): 1335-1343, 1974.
 20. BECK, E., STROHMAIER, K. Subtyping of European foot-and-mouth disease virus strains by nucleotide sequence determination. *J. Virol.*, 61 (5): 1621-1629, 1987.
 21. BERGMANN, I.E., AUGÉ DE MELLO, P., ALONSO, A., SCODELLER, E.A., CASAS OLASCOAGA, R., LA TORRE, J.L. Caracterización bioquímica y serológica de diferentes cepas de campo de virus de la fiebre aftosa aisladas en América del Sur./Biochemical and serological characterization of different field aphthovirus strains isolated in South America. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 51: 31-34, 1985.
 22. BERGMANN, I.E., AUGÉ DE MELLO, P., NEITZERT, E., GOMES, I. Diagnosis of cattle with persistent aphthovirus infections and their differentiation from vaccinated animals by enzyme-linked immunoelectrotransfer blot using bioengineered nonstructural antigens. *Am. J. Vet. Res.*, 54: 825-831, 1993.
 23. BERGMANN, I.E., TIRABOSCHI, B.H., BOLLER, M.A.A., MALIRAT, V., PEREIRA, P.J.V., AUGÉ DE MELLO, P. Desarrollo de un método más simple y rápido para el análisis bidimensional de oligonucleótidos del virus de la fiebre aftosa: minifingerprinting de ARN./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: 35-42, 1989.
 24. BULMAN, C.M. Hipersensibilidad post vacunal en la inmunización antiaftosa. *Gac. Vet. (B. Aires)*, 40 (330): 285-292, 1978.
 25. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA. Catálogo de Publicaciones 1952-1993. Rio de Janeiro, PANAFATOSA, 1994. 90 p.
 26. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA. Resoluciones y Recomendaciones de la Comisión Sudamericana para la Lucha contra la Fiebre Aftosa. 1973-1981. Rio de Janeiro, PANAFATOSA, 1982. p. (Serie de Monografías Científicas y Técnicas, 9).
 27. CUNHA, R.G. Demonstration of immune response to FMD vaccine in protection test in young adult mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 103 (4): 700-703, 1960.
 28. FEDERER, K.E., SAILE, J., HONIGMAN, M.N. Identification d'un nouveau sous-type A de virus aphteux. *Bull. Off. Int. Epizoot.*, 57 (7/8): 1171-1190, 1962.
 29. FERREIRA, M.E.V. Prueba de microneutralización para estudios de anticuerpos de la fiebre aftosa./Microtiter neutralization test for the study of foot-and-mouth disease antibodies. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 21-22: 17-24, 1976.
 30. GEBAUER, F., LA TORRE, J., GOMES, I., MATEU, M.G., BARAHONA, H., TIRABOSCHI, H., BERGMANN, I.E., AUGÉ DE MELLO, P. Rapid selection of genetic and antigenic variants of foot-and-mouth disease virus during persistence in cattle. *J. Virol.*, 62: 2041-2049, 1988.
 31. 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.
 32. GOMES, I., SUTMÖLLER, P., CASAS OLASCOAGA, R. Respuesta en bovinos a la exposición del virus de la fiebre aftosa un año después de inmunizados con vacuna con adyuvante oleoso./Response of cattle to foot-and-mouth dis-

- ease (FMD) virus exposure one year after immunization with oil adjuvanted FMD vaccine. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 37-38:25-35, 1980.
33. GOMES, I. Persistencia de anticuerpos circulantes en porcinos revacunados con vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso./Persistence of circulating antibodies in swine revaccinated with oil adjuvanted foot-and-mouth disease vaccine. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 39-40: 43-49, 1980.
 34. GOMES, M.P.D., SÖNDAHL, M.S., MARTINS, M.A., CASAS OLASCOAGA, R., ALONSO, A. Aplicación de la técnica inmunoenzimática (ELISA) para el diagnóstico de los virus de la fiebre aftosa y estomatitis vesicular en comparación con la prueba de fijación del complemento./Application of enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of foot-and-mouth disease virus and vesicular stomatitis in comparison with the complement fixation. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 55: 15-25, 1989.
 35. HENDERSON, W.M., CUNHA, R.G. Le contrôle de la production des vaccins anti-aphtheux à virus vivant atténué. In: *Symp. Int. Virol. Vet., Lyon, France*, 1962. p. 101-107.
 36. MAES, R., FERNANDES, M.V. Viability of foot-and-mouth disease virus in oil emulsions. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 132 (2): 447-449, 1969.
 37. NEITZERT, E., BECK, E., AUGÉ DE MELLO, P., GOMES, I., BERGMANN, I. 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. *Virology*, 184 (2): 799-804, 1991.
 38. NORAMBUENA, M.A. SERRÃO, U.M., GAGGERO, A.C. Vacuna contra la fiebre aftosa preparada de virus cultivado en células renales. *Bull. Off. Int. Epizoot.*, 57 (5/6): 618-619, 1962.
 39. NOTTEBOHN, A., GAGGERO, A.C., GOMES, I., CUNHA, R.G. Examen antigénique d'un vaccin anti-aphtheux inactivé (type "A" Vallée) préparé avec du virus cultivé sur des cellules BHK 21. *Bull. Off. Int. Epizoot.*, 61 (9/10): 919-933, 1964.
 40. OLASCOAGA, R.C., AUGÉ DE MELLO, P., ABARACÓN, D., GOMES, I., ALONSO F.A., MESQUITA, J., DARSIE, G.C., PINKOSKI, D.I., DEAK, J.G., GUBEL, J.G., BARBOSA, J.R. Producción y control de vacunas antiaftosa con adyuvante oleoso, en el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa y en el Laboratorio Regional de Apoyo Animal del Ministerio de Agricultura y Reforma Agraria, Brasil./Production and control of oil-adjuvanted foot-and-mouth disease vaccines at the Pan American Foot-and-Mouth Disease Center and the Regional Support Laboratory for Animal Health of the Ministry of Agriculture and Agrarian Reform, Brazil. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 56: 3-51, 1990.
 41. PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. *Inter-American Meeting, at the Ministerial Level, on Animal Health: final reports of the IV, V, VI and VII Meetings. (1985-1991)*. Washington, D.C., OPS, 1992.
 42. PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. *Inter-American Meeting, at the Ministerial Level, on Foot-and-Mouth Zoonoses Control*. Rio de Janeiro, Brazil, 14-17 March, 1969.
 43. PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. *XII Inter-American Meeting, at the Ministerial Level, on Foot-and-Mouth Disease and Zoonoses Control*. Willemstad, Curacao, 17-20 April, 1979.
 44. PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. *IV Meeting of the Hemispheric Committee for the Eradication of Foot-and-Mouth Disease (COHEFA)*. Washington, D.C., 2 April 1992. Final Report.
 45. XIX REGULAR MEETING OF THE SOUTH AMERICAN COMMISSION FOR THE CONTROL OF FOOT-AND-MOUTH DISEASE, Montevideo, Uruguay, March 25-26, 1992. Final Report.
 46. SUTMÖLLER, P., AUGÉ DE MELLO, P., HONIGMAN, M.N., FEDERER, K.E. Infectivity for cattle and pigs of three strains of foot-and-mouth disease virus isolated from carrier cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 28 (122): 101-105, 1967.
 47. SUTMÖLLER, P., GAGGERO, A.C. Foot-and-mouth disease carriers. *Vet. Rec.*, 77 (33): 968-969, 1965.
 48. SUTMÖLLER, P., VIEIRA, A. Relación de títulos de anticuerpos neutralizantes y la protección de bovinos frente al virus de la fiebre aftosa./The relationship of neutralizing antibody titers for foot-and-mouth disease virus and the protection of cattle. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 39-40: 51-62, 1980.
 49. VIANNA FILHO, Y.L., ASTUDILLO, V., GOMES, I., FERNÁNDEZ, G., ROZAS, C.E.E., RAVISON, J.A., ALONSO, A. Potency control of foot-and-mouth disease vaccine in cattle. Comparison of the 50% protective dose and the protection against generalization. *Vaccine*, 11 (14): 1424-1428, 1993.

THE RELEVANCE OF THE RESEARCH AND DEVELOPMENT PROGRAMS OF PANAFTOSA TO THE CONTROL AND ERADICATION OF FOOT-AND-MOUTH DISEASE IN THE AMERICAS

V. ASTUDILLO, T.R. DOEL, V.M. VARELA-DÍAZ

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

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

SUMMARY. The contribution made by the Pan American Foot-and-Mouth Disease Center to our knowledge of vesicular diseases of animals and, in particular, foot-and-mouth disease, has assisted greatly the control programs initiated during the last four decades. This review examines the relevance of past research and explores future directions for research and development in relation to the control and eradication of the disease from the Americas.

The Pan American Foot-and-Mouth Disease Center (PANAFTOSA), located in Rio de Janeiro, Brazil, is part of the Pan American Health Organization/World Health Organization (PAHO/WHO). Since its creation in 1951 by the Organization of American States, with the support of the Pan American Sanitary Bureau and the Inter-American Institute for Cooperation in Agriculture, it has made significant contributions to the control of foot-and-mouth disease (FMD) in Latin America by virtue of its numerous activities. These include the role of Reference Laboratory for Vesicular Diseases for the Americas, involvement in technical cooperation and coordination of programs at the national and international levels aimed at the prevention, control and eradication of FMD in Latin America, FMD vaccine production, research and development. In 1968, PANAFTOSA came under the administrative control of PAHO.

In 1958, the Food and Agriculture Organization (FAO) and the World Reference Laboratory (WRL), Pirbright, U.K., officially recognized PANAFTOSA as the coordinating organization for FMD campaigns in South America and as the communication channel between the countries and the WRL. This status was accepted in 1960 by the Office International des Epizooties at its XXVIII General Session.

In 1969, the Ministers of Agriculture of the region attending the II Inter-American Meeting on FMD and other Zoonoses (RICAZ) in Brazil agreed, in the form of Resolution X, to recognize PANAFTOSA as the Regional Reference Laboratory of the Americas for FMD diagnosis (42). In 1979, the Ministers of Agriculture of the region, at the XII RICAZ Meeting in Curaçao, also agreed under Resolution V, to recognize PANAFTOSA as Regional Reference Laboratory for quality control of FMD vaccines (43). In 1992, the XIX Regular Meeting of the South American Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease (COSALFA), in Argentina, through Resolution V, appointed PANAFTOSA as the

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

Reference Laboratory of the region for the epidemiological surveillance of vesicular diseases (45).

POLITICAL AND TECHNICAL DIRECTION

Within the Americas, there are three international forums which are pivotal to the establishment of political and technical directives governing FMD prevention, control and eradication programs in the hemisphere. These are:

1. The Inter-American Meeting, at the Ministerial Level, on Animal Health (RIMSA, known as RICAZ prior to 1980) which takes place every two years to discuss animal health policies in the region. Typically (41), these meetings operate against a background of working documents provided by PAHO and resolutions from meetings such as COSALFA and COHEFA (see below) and culminate in resolutions by the representatives of the member countries. As a consequence, requests or recommendations may be made to PAHO or to member countries to implement or otherwise a course of action. RIMSA also analyzes the programs and budgets of the PAHO Centers for the next two years and makes appropriate recommendations to the Director of PAHO for future activities.

2. The Hemispheric Committee for the Eradication of Foot-and-Mouth Disease (COHEFA), which is formed by representatives of the public sector (Ministries of Agriculture) and private sector (producers) of six subregions of the Americas. This meets every two years at the same time as RIMSA but deals primarily with technical aspects of the programs for the prevention, control and eradication of FMD (44) in the Americas. COHEFA also oversees the financing of the Hemispheric Plan for the Eradication of FMD. Resolutions of COHEFA are channelled to the RIMSA meeting for further discussion and recommendation to member countries, COSALFA or PAHO, as appropriate.

3. COSALFA which consists of directors of animal health of the South American countries, meets annually and acts as an advisory group for

the Director of the Center, who serves as Secretary ex officio. The objectives of COSALFA are to promote, coordinate and evaluate national programs, subregional projects and border agreements regarding FMD in the countries of the region (26).

The research projects and technical activities of the Center are also evaluated by an ad hoc Scientific Advisory Committee made up of scientists of international repute who submit their conclusions and recommendations to the Director of PAHO.

OPERATIONAL BASIS OF PANAFTOSA

Much of the work of PANAFTOSA is conveniently divided into two areas. The first of these is that of Field Services, which interacts closely with member countries and provides support in many ways, including operation of the vesicular disease continental surveillance system, consultant and advisory services and technical assistance on different aspects of the control programs, and training and information.

The second area is that of Laboratory Services, encompassing research, development and scientific services. This area in turn is underpinned by essential support services such as those provided by the small and large animal experimental groups and the tissue culture laboratory. In certain respects, the Laboratory Services are remote from the customers, the veterinary authorities of the member countries, but this does not in any way minimize the importance of its work. The following section, in which the scientific achievements of the Center are reviewed, attempts to show the crucial role that research and development have played and will continue to play in the diagnosis and control of FMD in the Americas.

ACHIEVEMENTS AND FUTURE ACTIVITIES OF THE LABORATORY SERVICES

Staff of the research laboratories of the Center have contributed to our knowledge of a wide

variety of topics in vesicular diseases of animals, with particular reference to the diagnosis and control of FMD. A catalogue of the Center's publications from 1952 to 1993 has recently become available and provides a useful summary of the scientific activities of PANAFTOSA over four decades (25). Through close interaction and collaboration with the diagnosis and vaccine production laboratories, many of the developments at the research level have been transferred effectively to practical applications.

As stated previously, PANAFTOSA has the role of Reference Laboratory for the Americas and, accordingly, one of its major functions is to analyze samples submitted by member countries. These may be sera for use in antibody assays or tissue samples/vesicular fluid for virus detection assays. In the last decade alone, the diagnostic laboratory has processed 38,582 samples and clearly plays a vital role in the vesicular disease surveillance service of the Center. Because of the need for a comprehensive knowledge of the strains of FMD circulating in the field and aspects such as their relationship with vaccine strains, workers in this sector have been particularly active in the serological characterization of FMD strains occurring in Latin America using a range of techniques (6,8,21,28,34). Since the mid-eighties, basic characterization studies have been supplemented by molecular biological techniques including oligonucleotide mapping and nucleic acid sequencing (21,23), as well as the selective application of monoclonal antibodies developed against major strains of FMD (11). It is anticipated that the high definition which can be achieved with the more modern serological and molecular biological techniques will make routine diagnosis in the future even more reliable than at present. Equally, more investigative molecular epidemiology will be expected to play an increasingly important role as the numbers of FMD outbreaks are reduced by the effective implementation of control programs.

Research into FMD vaccines has always been a dominant feature of the activities of PANAFTOSA (40). Early studies which examined the susceptibility of different cells were followed by the adoption and exploitation of virus

production in both the Frenkel system and BHK-21 cells (4,38,39). During this period, there were also extensive studies made with attenuated forms of the virus because of the considerable successes achieved with other attenuated virus vaccines (35). However, the numerous problems associated with the use of attenuated FMD vaccines led to the exclusive development and use of inactivated preparations. In this respect, the Center was at the forefront and made invaluable contributions in the areas of inactivation kinetics and adjuvancy. The deficiencies of formaldehyde inactivation were soon recognized by the FMD world and the problem of obtaining the preferred inactivant, acetyleneimine, prompted the evaluation of alternatives of which binary ethyleneimine (BEI) was the most successful (18,19). BEI is a very effective inactivant provided it is used correctly and a colorimetric procedure was developed for monitoring the synthesis of the reagent immediately prior to its use at the industrial level. BEI is now used almost exclusively throughout the world in the production of FMD vaccines.

The Center is also known for its pioneering work on adjuvants for FMD vaccines, with particular reference to oil-based preparations (1,2,3,5,14,15,16,17,32,33,36,40). Numerous publications covering the quality and duration of immunity of cattle vaccinated with different preparations have culminated in the production by PANAFTOSA of oil adjuvanted FMD vaccines because of their superiority over classical aluminum hydroxide/saponin formulations. This type of vaccine is also gaining wider acceptance worldwide for the same reasons. Oil-based vaccines have also been developed for pigs. The justification for research aimed at vaccine improvement is simple. Vaccines against FMD, and particularly the aluminum hydroxide/saponin preparations, have to be applied regularly and comprehensively in order to achieve high and durable levels of herd immunity. Both economic and logistic considerations make the development of even better FMD vaccines a high priority and the Center will maintain its commitment within this area both with respect to improved adjuvants and delivery systems as well as investigations into recombinant vaccines. The

latter have the considerable advantage of freedom from potential contamination with live virus, a problem identified particularly in Europe following the reduction of outbreaks of disease due to contaminated meat and livestock (20).

In common with several other FMD laboratories, staff of the Center are also in the process of establishing a significant reserve (bank) of concentrated, inactivated FMD antigens which are stored at very low temperatures. These antigens will be reserved for formulation into vaccine in emergencies where conventional supplies are unavailable. Such antigen banks are particularly relevant, therefore, to the hemispheric plan for the eradication of FMD because of the generation of extensive disease-free areas and the corresponding loss of incentive for commerce and government laboratories to continue FMD vaccine production.

Potency and safety testing of vaccines made by both the Center's facility and by production units elsewhere has also represented a major area of work. The mouse protection test was developed by staff as a less costly alternative to live virus challenge testing in cattle. Similar studies have examined other approaches, including measurement of serum neutralizing antibodies and their correlation with potency in cattle (9,12,13,27,29,31,48,49). In this respect, the Center has a significant advantage over other FMD laboratories because of the very large number of sera and quantity of cattle potency data available to it through its role in Latin America. Safety of FMD vaccines with particular respect to allergic responses in cattle has also formed the basis of studies by staff of the Center (24).

A continuing concern among animal health authorities world-wide is the issue of persistence of FMD in cattle following recovery from infection or field challenge of vaccinated livestock, and numerous studies at the Center (30,46,47) and elsewhere have addressed the key questions. In fact, there is very little evidence of transmission from 'carrier' animals to fully susceptible livestock despite considerable attempts to demonstrate this experimentally. Nevertheless, a finite risk is perceived by the animal health authorities and the detection of persistence in cattle remains an impor-

tant issue. Classically this has been done, and will continue to be done for the foreseeable future, by the culture of probang fluids with susceptible cells.

Other approaches have been developed at PANAFTOSA to augment the infectivity assays including the measurement of antibody titres against one of the non-structural proteins of the virus, the so-called VIA antigen (7,10). This test gives some indication of whether an animal has been vaccinated and/or infected. Like all serological techniques, however, the VIA test has its limitations and is just one of an array of tests done by workers at the Center to assess the immune status of an animal. A new test, currently under evaluation, examines antibody levels against all of the non-structural proteins of the virus (22,37). The individual proteins, which are purified from recombinant bacteria, are electrophoresed in polyacrylamide gels and then blotted onto nitrocellulose strips. The strips are then soaked in a very small volume of cattle sera, followed by anti-species antibodies and positively staining bands detected by classical ELISA conjugates and substrates. In view of the overall goal to eradicate FMD from the hemisphere by a combination of vaccination and zoosanitary measures, this key area will assume even greater importance in order to discriminate between virus-infected and virus-free livestock. International acceptance of such tests will have profound implications for the export from Latin America of both carcasses and livestock.

CONCLUSIONS

This brief review of the role of the Laboratory Services of PANAFTOSA is not intended to be comprehensive but rather to highlight the past and present research contributions by staff of the Center in the overall scheme to control and eradicate FMD in the Americas. For the future, the research programme of the Center is expected to be highly flexible and dynamic to meet both the needs of the Field Services of PANAFTOSA and those of the FMD affected countries. The different epidemiological situations which will arise as a consequence of the progressive eradication of this highly

contagious disease will pose new questions and provide the stimulus for new approaches for diagnosis and control. The role of the Laboratory Services of PANAFTOSA will be crucial in the eradication of FMD and the maintenance of the disease-free state.

REFERENCES

1. ABARACÓN, D., MAGALLANES, N., CHARLES, E.G., DURINI, L.A., FRICK, E., DEGIORGI DE BURGHI, E., RADISICH, T. Vida útil de una vacuna antiaftosa inactivada con adyuvante oleoso./Shelf life of inactivated oil-adjuvanted foot-and-mouth disease vaccine. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 37-38: 17-24, 1980.
2. ABARACÓN, D., MESQUITA, J.A., SALLÚA, S., PÉREZ RAMA, R. Emulsificante Montanide 888 para la preparación de vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso./Montanide 888 emulsifying agent for preparation of oil-adjuvanted foot-and-mouth disease vaccine. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 45-46: 51-57, 1982.
3. ABARACÓN, D., MESQUITA, J.A., GIACOMETTI, H., SALLÚA, S., PÉREZ RAMA, R. Preparación de vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso usando antígenos adsorbidos sobre hidróxido de aluminio./Formulation of oil-adjuvanted foot-and-mouth disease vaccines containing antigen adsorbed to aluminum hydroxide. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 45-46: 43-50, 1982.
4. ABREU MARTINS, I. Producción económica de virus aftoso para fabricación de vacunas por el método Frenkel. *Cienc. Vet., México*, 5 (6): 489-496, 1960.
5. ABREU MARTINS, I. Vacunas antiaftosas hidróxido-saponinadas inactivadas por el formol. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 1: 1-19, 1971.
6. ALONSO, A. Types and subtypes of foot-and-mouth disease virus currently found in South America. *Br. Vet. J.*, 134: 53-57, 1978.
7. ALONSO, A., AUGÉ DE MELLO, P., GOMES, I., ROSENBERG, F.J. El uso del antígeno asociado a la infección viral (VIA) en la detección de ganado expuesto al virus de la fiebre aftosa./The use of virus-infection-associated antigen (VIA) in the detection of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus. (Brief report). *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 17-18: 17-22, 1975.
8. ALONSO, A., AUGÉ DE MELLO, P., ROSENBERG, F.J. Serological and immunological relationship of FMD viruses type C in South America. In: *FAO. Rep. Res. Gp. Stand. Techn. Com. Eur. Comm. Control FMD*. Brescia/Padua, Italy, 23-26 September 1975. p. 138-147.
9. ALONSO, A., CASAS OLASCOAGA, R., BAHNEMANN, H.G., ASTUDILLO, V., SÖNDAHL, M.S., GOMES, I., BALTAR, J., FERNÁNDEZ, G. Producción y control de calidad de la vacuna antiaftosa en América del Sur./ Production and quality control of foot-and-mouth disease vaccines in South America. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 51: 3-22, 1985.
10. ALONSO, A., GOMES, M.P.D., MARTINS, M.A., SÖNDAHL, M.S. Detection of foot-and-mouth disease virus infection-associated antigens antibodies: comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay and agar gel immunodiffusion tests. *Prev. Vet. Med.*, 9: 233-240, 1990.
11. ALONSO, A., GOMES, M.P.D., RAMALHO, A.K., ALLENDE, R., BARAHONA, H., SÖNDAHL, M.S., OSORIO, F.A. Characterization of foot-and-mouth disease virus by monoclonal antibodies. *Viral Immunology*, 6 (3): 210-228, 1993.
12. ALONSO, A., GOMES, I., VIEIRA, A. Control de vacunas antiaftosas. Relación entre el índice K (modificado) y los índices de seroprotección y seroneutralización. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 6: 1-16, 1971.
13. ASTUDILLO, V., GOMES, I., WANDERLEY, M. Precisión de la prueba de seroprotección en la evaluación del nivel de anticuerpos de fiebre aftosa./ Precision of the mouse protection test in evaluating foot-and-mouth disease antibody levels. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 23-24: 25-31, 1976.
14. 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./Field application of inactivated oil adjuvanted foot-and-mouth disease virus vaccine: vaccination and revaccination of young cattle. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 19-20: 31-47, 1975.
15. AUGÉ DE MELLO, P., ASTUDILLO, V., GOMES, I., CAMPOS GARCÍA, J.T. Respuesta inmunitaria de bovinos adultos vacunados contra la fiebre aftosa con vacuna oleosa./Immune response of adult cattle vaccinated with oil adjuvanted foot-and-mouth disease vaccines. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 26: 23-29, 1977.
16. AUGÉ DE MELLO, P., GOMES, I. Respuesta anamnésica en bovinos a la revacunación con vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso./Anam-

- nostic response in cattle after revaccination with oil adjuvanted foot-and-mouth disease vaccines. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 27-28: 49-60, 1977.
17. AUGÉ DE MELLO, P., GOMES, I. Vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso para cerdos. I. Vacuna de emulsión doble aplicada por diferentes vías./Foot-and-mouth disease oil adjuvanted vaccines for pigs. I. Double emulsion vaccine applied by different routes. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 31-32: 1-12, 1978.
 18. BAHNEMANN, H.G. Empleo de la etileneimina y la propileneimina como agentes inactivantes del virus de la fiebre aftosa./The inactivation of foot-and-mouth disease virus by ethylenimine and propylenimine. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 7: 41, 1972.
 19. BAHNEMANN, H.G., AUGÉ DE MELLO, P., ABARACÓN, D., GOMES, I. Immunogenicity in cattle of foot-and-mouth disease vaccines inactivated with binary ethylenimine. *Bull. Off. Int. Epizoot.*, 81 (11-12): 1335-1343, 1974.
 20. BECK, E., STROHMAIER, K. Subtyping of European foot-and-mouth disease virus strains by nucleotide sequence determination. *J. Virol.*, 61 (5): 1621-1629, 1987.
 21. BERGMANN, I.E., AUGÉ DE MELLO, P., ALONSO, A., SCODELLER, E.A., CASAS OLASCOAGA, R., LA TORRE, J.L. Caracterización bioquímica y serológica de diferentes cepas de campo de virus de la fiebre aftosa aisladas en América del Sur./Biochemical and serological characterization of different field aphthovirus strains isolated in South America. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 51: 31-34, 1985.
 22. BERGMANN, I.E., AUGÉ DE MELLO, P., NEITZERT, E., GOMES, I. Diagnosis of cattle with persistent aphthovirus infections and their differentiation from vaccinated animals by enzyme-linked immunoelectrotransfer blot using bioengineered nonstructural antigens. *Am. J. Vet. Res.*, 54: 825-831, 1993.
 23. BERGMANN, I.E., TIRABOSCHI, B.H., BOLLER, M.A.A., MALIRAT, V., PEREIRA, P.J.V., AUGÉ DE MELLO, P. Desarrollo de un método más simple y rápido para el análisis bidimensional de oligonucleótidos del virus de la fiebre aftosa: minifingerprinting de ARN./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: 35-42, 1989.
 24. BULMAN, C.M. Hipersensibilidad post vacunal en la inmunización antiaftosa. *Gac. Vet. (B. Aires)*, 40 (330): 285-292, 1978.
 25. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA. Catálogo de Publicaciones 1952-1993. Rio de Janeiro, PANAF-TOSA, 1994. 90 p.
 26. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA. Resoluciones y Recomendaciones de la Comisión Sudamericana para la Lucha contra la Fiebre Aftosa. 1973-1981. Rio de Janeiro, PANAF-TOSA, 1982. p. (Serie de Monografías Científicas y Técnicas, 9).
 27. CUNHA, R.G. Demonstration of immune response to FMD vaccine in protection test in young adult mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 103 (4): 700-703, 1960.
 28. FEDERER, K.E., SAILE, J., HONIGMAN, M.N. Identification d'un nouveau sous-type A de virus aphteux. *Bull. Off. Int. Epizoot.*, 57 (7/8): 1171-1190, 1962.
 29. FERREIRA, M.E.V. Prueba de microneutralización para estudios de anticuerpos de la fiebre aftosa./Microtiter neutralization test for the study of foot-and-mouth disease antibodies. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 21-22: 17-24, 1976.
 30. GEBAUER, F., LA TORRE, J., GOMES, I., MATEU, M.G., BARAHONA, H., TIRABOSCHI, H., BERGMANN, I.E., AUGÉ DE MELLO, P. Rapid selection of genetic and antigenic variants of foot-and-mouth disease virus during persistence in cattle. *J. Virol.*, 62: 2041-2049, 1988.
 31. 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.
 32. GOMES, I., SUTMÖLLER, P., CASAS OLASCOAGA, R. Respuesta en bovinos a la exposición del virus de la fiebre aftosa un año después de inmunizados con vacuna con adyuvante oleoso./Response of cattle to foot-and-mouth disease (FMD) virus exposure one year after immunization with oil adjuvanted FMD vaccine. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 37-38: 25-35, 1980.
 33. GOMES, I. Persistencia de anticuerpos circulantes en porcinos revacunados con vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso./Persistence of circulating antibodies in swine revaccinated with oil adjuvanted foot-and-mouth disease vaccine. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 39-40: 43-49, 1980.
 34. GOMES, M.P.D., SÖNDAHL, M.S., MARTINS, M.A., CASAS OLASCOAGA, R., ALONSO, A. Aplicación de la técnica inmunoenzimática

- (ELISA) para el diagnóstico de los virus de la fiebre aftosa y estomatitis vesicular en comparación con la prueba de fijación del complemento./Application of enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of foot-and-mouth disease virus and vesicular stomatitis in comparison with the complement fixation. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 55: 15-25, 1989.
35. HENDERSON, W.M., CUNHA, R.G. Le contrôle de la production des vaccins anti-aphtheux à virus vivant atténué. In: *Symp. Int. Virol. Vet., Lyon*, France, 1962. p. 101-107.
 36. MAES, R., FERNANDES, M.V. Viability of foot-and-mouth disease virus in oil emulsions. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 132 (2): 447-449, 1969.
 37. NEITZERT, E., BECK, E., AUGÉ DE MELLO, P., GOMES, I., BERGMANN, I. 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. *Virology*, 184 (2): 799-804, 1991.
 38. NORAMBUENA, M.A. SERRÃO, U.M., GAGGERO, A.C. Vacuna contra la fiebre aftosa preparada de virus cultivado en células renales. *Bull. Off. Int. Epizoot.*, 57 (5/6): 618-619, 1962.
 39. NOTTEBOHN, A., GAGGERO, A.C., GOMES, I., CUNHA, R.G. Examen antigénique d'un vaccin anti-aphtheux inactivé (type "A" Vallée) préparé avec du virus cultivé sur des cellules BHK 21. *Bull. Off. Int. Epizoot.*, 61 (9/10): 919-933, 1964.
 40. OLASCOAGA, R.C., AUGÉ DE MELLO, P., ABARACÓN, D., GOMES, I., ALONSO F.A., MESQUITA, J., DARSIE, G.C., PINKOSKI, D.I., DEAK, J.G., GUBEL, J.G., BARBOSA, J.R. Producción y control de vacunas antiaftosa con adyuvante oleoso, en el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa y en el Laboratorio Regional de Apoyo Animal del Ministerio de Agricultura y Reforma Agraria, Brasil./Production and control of oil-adjuvanted foot-and-mouth disease vaccines at the Pan American Foot-and-Mouth Disease Center and the Regional Support Laboratory for Animal Health of the Ministry of Agriculture and Agrarian Reform, Brazil. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 56: 3-51, 1990.
 41. PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. *Inter-American Meeting, at the Ministerial Level, on Animal Health: final reports of the IV, V, VI and VII Meetings. (1985-1991)*. Washington, D.C., OPS, 1992.
 42. PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. *Inter-American Meeting, at the Ministerial Level, on Foot-and-Mouth Zoonoses Control*. Rio de Janeiro, Brazil, 14-17 March, 1969.
 43. PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. *XII Inter-American Meeting, at the Ministerial Level, on Foot-and-Mouth Disease and Zoonoses Control*. Willemstad, Curacao, 17-20 April, 1979.
 44. PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. *IV Meeting of the Hemispheric Committee for the Eradication of Foot-and-Mouth Disease (COHEFA)*. Washington, D.C., April 1992. Final Report.
 45. XIX REGULAR MEETING OF THE SOUTH AMERICAN COMMISSION FOR THE CONTROL OF FOOT-AND-MOUTH DISEASE, Montevideo, Uruguay, March 25-26, 1992. Final Report.
 46. SUTMÖLLER, P., AUGÉ DE MELLO, P., HONIGMAN, M.N., FEDERER, K.E. Infectivity for cattle and pigs of three strains of foot-and-mouth disease virus isolated from carrier cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 28 (122): 101-105, 1967.
 47. SUTMÖLLER, P., GAGGERO, A.C. Foot-and-mouth disease carriers. *Vet. Rec.*, 77 (33): 968-969, 1965.
 48. SUTMÖLLER, P., VIEIRA, A. Relación de títulos de anticuerpos neutralizantes y la protección de bovinos frente al virus de la fiebre aftosa./The relationship of neutralizing antibody titers for foot-and-mouth disease virus and the protection of cattle. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 39-40: 51-62, 1980.
 49. VIANNA FILHO, Y.L., ASTUDILLO, V., GOMES, I., FERNÁNDEZ, G., ROZAS, C.E.E., RAVISON, J.A., ALONSO, A. Potency control of foot-and-mouth disease vaccine in cattle. Comparison of the 50% protective dose and the protection against generalization. *Vaccine*, 11 (14): 1424-1428, 1993.

ASPECTOS INTERSECTORIALES E INTERDISCIPLINARIOS EN LOS SISTEMAS DE ATENCIÓN VETERINARIA LOCAL

V. ASTUDILLO, A. ZOTTELE

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

RESUMEN. Se observan cambios profundos en los sistemas de atención veterinaria que se caracterizan por la creciente participación de los productores en diversas campañas de sanidad animal, en particular en el control de la fiebre aftosa. Este proceso se inscribe en la descentralización administrativa de un significativo número de actividades sanitarias. La atención a nivel local y la participación han sido un estímulo y una exigencia para que las instituciones relacionadas con la actividad agropecuaria coordinen esfuerzos para la promoción del desarrollo. Por otra parte, hay una creciente demanda para que, en la elaboración y seguimiento de los planes de trabajo y de investigación agropecuaria en el ámbito geográfico del sistema, participen técnicos de las diversas disciplinas, orientándose a tratar a los problemas sanitarios conjuntamente con los aspectos relacionados a la productividad y la rentabilidad pecuaria.

Los sistemas de atención veterinaria se definen como conjuntos de instituciones, públicas y privadas, que producen actividades organizadas para actuar sobre el perfil de salud de los animales agrícolas y de la salud pública. Materializan las políticas específicas a través de la ejecución de acciones y servicios organizados de acuerdo con los lineamientos y las estrategias globales trazadas en cada país, y en el contexto de sus sistemas productivos y sociales (11, 12).

Los sistemas de atención veterinaria en salud animal se han diversificado en tres sectores: a) servicio veterinario oficial, b) servicios veterinarios de cooperativas o de organismos integrados de producción, y c) atención privada.

En los últimos años se ha favorecido la configuración de los sistemas locales de atención veterinaria operando con un variado nivel de participación social, como una alternativa para afrontar, con mejores resultados, las actividades de prevención, control y erradicación de las enfermedades de los animales.

En esta tarea juega un papel decisivo la iniciativa que, en varios países, los productores han asumido a través de sus organizaciones. Asimismo, las acciones generadas a partir de ese enfoque promueven cambios desde el punto de vista organizacional, financiero y del desarrollo de mecanismos de asistencia sanitaria (vacunación, control de focos y de tránsito de animales) y de los sistemas de información y vigilancia epidemiológica.

Dos aspectos centrales de esta problemática son, la participación de los diversos sectores

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

comprometidos, directa o indirectamente, en la promoción de la salud animal en tanto esta depende de determinantes generales (13), y la incorporación de las distintas disciplinas que explican, desde múltiples perspectivas metodológicas, el origen de los problemas de salud animal, así como su evolución y los mecanismos sociales e institucionales para modificar cierto estado no deseable.

FORTALECIMIENTO DE LA ATENCIÓN VETERINARIA LOCAL E INTERSECTORIALIDAD

Los sistemas de atención veterinaria tienden a consolidarse a nivel local por el impacto de dos fenómenos convergentes: por un lado, la crisis de los estados latinoamericanos que se materializa en la incapacidad de generar la cantidad y calidad de bienes y servicios ofrecidos en décadas anteriores; por el otro, la percepción de que los modelos centralizados y verticalistas de atención no permiten avanzar en las tareas de erradicación de enfermedades críticas para la producción y el comercio de animales agrícolas y sus subproductos.

El deterioro de los servicios públicos de atención veterinaria característico de la última década, y su excesivo grado de centralización y burocratización acentuó ya limitada capacidad efectiva de introducir, en el medio pecuario, modificaciones significativas sobre la salud y la producción animal.

Como una derivación de esta situación, se produjo un desgaste que ha afectado el trabajo sanitario de los prestadores de servicios de atención veterinaria, así como también la motivación de los segmentos sociales vinculados a la ganadería.

En varios países del continente se desarrolló una nueva concepción que crea un ambiente de responsabilidades recíprocas entre servidores y beneficiarios en niveles locales. Estas son factibles de materializar, movilizandolos recursos locales, para que las operaciones sanitarias sean más efectivas, eficientes y oportunas, en respuesta a necesidades reales de la ganadería del lugar.

En la medida en que se desarrolla la capacidad de análisis y la comprensión de la realidad ganadera

y de la situación de la salud animal en el nivel local, y se identifican y coordinan los recursos existentes para producir servicios de atención veterinaria, se abre la posibilidad de ofrecer una mejor respuesta a los problemas de la producción animal (9).

Se han formulado proposiciones de reorientación técnico-administrativa de la atención veterinaria (7). El fortalecimiento de las operaciones sanitarias locales y el consiguiente desarrollo de la participación social y de la coordinación intersectorial a ese nivel, han sido considerados como instrumentos para lograr una mayor efectividad de las acciones asistenciales, y una mayor eficiencia en la gestión administrativa.

Desde el punto de vista estatal, esta concepción responde a requerimientos de descentralización del aparato oficial, buscando una mayor participación social y efectividad de acción. Con esta reorientación organizativa se persigue lograr una mayor capacidad de respuesta, bajo un criterio geográfico-poblacional, a las demandas cambiantes y específicas de agrupaciones ganaderas afectadas por problemas epidemiológicos más o menos comunes.

Para llevar a cabo esta reorientación, en el mecanismo local de atención veterinaria debe existir la capacidad de articular, dentro de un espacio poblacional determinado, todos los recursos disponibles en función de una mejor asistencia sanitaria animal.

La acción intersectorial en salud animal consiste en *la intervención coordinada de instituciones representativas de más de un sector social, en acciones destinadas total o parcialmente a abordar problemas más relacionados con la salud animal*. Esta acción permite la promoción y el desarrollo de la atención veterinaria a nivel local, así como la articulación de recursos financieros y de cualquier otro tipo, para dar apoyo a los programas de salud animal.

Los sistemas de atención veterinaria local se sustentan, en síntesis, en la participación de las instituciones públicas y privadas productoras de acciones de protección y fomento de la salud de las poblaciones de los animales agrícolas. Se incluyen las asociaciones de productores, agroindustrias, universidades, institutos de investigación agro-

pecuaria, gremios profesionales, y ministerio o secretarías de agricultura. Pero otros sectores de salud, educación, y alcaldías, entre otros, son esenciales para la promoción de la salud animal y, además, son beneficiarios directos de los cambios en los perfiles de desarrollo ganadero.

En el manejo del sistema local existen postulados que permiten un mejor funcionamiento (3, 5, 6, 8), tales como descentralizar técnica y administrativamente el manejo de los recursos y de los mecanismos tácticos y operativos; identificar las necesidades prioritarias de atención y elaborar un plan estratégico local; administrar acciones de salud, como vacunaciones, vigilancia epidemiológica, control de tránsito, control de focos, etc.; y, participar activamente en la ejecución y evaluación del plan estratégico local.

En un escenario de política agropecuaria nacional, estos sistemas tienden necesariamente a una integración, tanto con los programas sanitarios existentes para el control o erradicación de enfermedades de los animales, como con otros programas vinculados a la productividad y rentabilidad pecuaria.

En este contexto, las universidades, particularmente las facultades de ciencias veterinarias o zootécnicas, tienen condiciones favorables para incorporar a sus miembros en los análisis de la problemática sanitaria. Esto conlleva la proyección de la universidad hacia la comunidad, a la capacitación teórico-práctica de los alumnos, y a la captación de ingresos propios para esos centros de estudio.

Un censo actualizado de proyectos y convenios con organizaciones nacionales o internacionales que estén en ejecución en la región con relación al sector pecuario, es de importancia vital para identificar objetivos comunes que permitan la integración y el ahorro de recursos.

La regionalización de los sistemas productivos y los canales de comercialización determinan, en sus actores sociales, intereses marcados por las etapas del control sanitario de los animales.

Existen experiencias de incorporación de la agroindustria a las exigencias de requisitos sanitarios, establecidos para la recepción de productos como la leche y la carne, e incluso en la

diferenciación de precios de acuerdo con la condición sanitaria, en la asignación de tareas, dentro del sistema local, a sus médicos veterinarios de asistencia técnica, y en la constitución de fondos rotativos para la adquisición de biológicos (2). También, este es el caso específico de los laboratorios productores de fármaco-químicos y biológicos, la capacitación y divulgación de las actividades del programa, y la instrumentación de ensayos para evaluar el comportamiento de sus productos en el campo. Es de gran trascendencia el aporte que el sector educación o el poder municipal pueden dar a un modelo de promoción de salud animal.

En última instancia, los procesos determinantes de un perfil de salud dado responden a problemas que trascienden con mucho el sistema específico de atención veterinaria (1) y, por lo tanto, exigen niveles de intervención más complejos que reclaman una acción intersectorial.

En la estructura local de producción animal se consideran a los pequeños propietarios como preocupados por problemas que no siempre coinciden con ciertas estrategias nacionales. Sin embargo, el hecho de atender los principales problemas que influyen en su producción y productividad, y de dar prioridad en la asignación de recursos públicos hacia este sector de la población, favorece una mayor y mejor participación.

Los gremios profesionales y en especial los Colegios Médico Veterinarios constituyen una pieza importante en el engranaje de los servicios locales de atención veterinaria. Aportan experiencias propias de sus actividades en la jurisdicción, útiles para el análisis de la situación de salud y la construcción del citado plan estratégico. Este tipo de organización es un instrumento para incrementar la vinculación con los sectores sociales, económicos y políticos, para intervenir en la elaboración de propuestas de desarrollo, para ampliar la demanda de trabajo y para acordar tarifas por servicios según costos, ubicación geográfica y tipo de actividad.

La integración de las labores ejecutadas por los Ministerios de Salud y de Agricultura a través de la atención veterinaria es fundamental para la

transformación de la situación de salud. Una organización de esta naturaleza demanda la disponibilidad de profesionales como "promotores de salud". De ahí la importancia de formar a los funcionarios en esta materia y de diseñar políticas de adiestramiento, con este contenido, en las instituciones nacionales y agencias internacionales de cooperación técnica.

Los sistemas locales de atención veterinaria configuran un instrumento fundamental para la elaboración de políticas y estrategias acordes con la realidad del campo, las organizaciones políticas y sociales, las factibilidades de acción en armonía con la infraestructura existente, los sistemas de producción y el perfil epidemiológico identificado; y más aún, contribuirían a obtener el apoyo político para la continuidad administrativa de los programas de salud animal y su integración a las políticas de desarrollo.

Los sistemas locales de salud demuestran cuál es la práctica de la intersectorialidad y cuáles son los resultados que pueden esperarse de ese proceso.

INTERDISCIPLINARIDAD Y LA ATENCIÓN VETERINARIA LOCAL

Los fenómenos de la salud animal tratados desde una perspectiva epidemiológica son fenómenos articulados a la problemática que tratan las ciencias sociales. Por otra parte, la realidad social en su complejidad requiere que sea abordada con diversos instrumentos metodológicos, teóricos e instrumentales que se construyen a partir de distintas disciplinas.

A los aspectos biológicos deben agregarse los elementos culturales, económicos, políticos, geográficos, demográficos, que constituyen la realidad en la que debe desenvolverse la atención veterinaria.

La intersectorialidad lleva implícita la interdisciplinaridad, porque pone en evidencia que el problema de la atención veterinaria no es apenas un problema con especies susceptibles a diversas enfermedades, sino fundamentalmente un problema social, en el que intervienen diversos actores con variados intereses (10).

Este enfoque es particularmente necesario cuando se analiza la problemática a nivel local,

porque cada grupo social con intereses específicos en la actividad económico-ganadera tiene una "forma de ver y analizar" un problema específico, en relación a su eficacia socioeconómica con relación a sus intereses (4). Frente a la explicación de la presentación reiterada de algunos problemas de salud animal y de sus soluciones, en América Latina se ha observado una confrontación de conceptos, teorías, métodos y técnicas, creándose así un ámbito de conflictos y consensos entre los actores sociales.

La legitimidad de una forma de pensamiento frente a la sociedad, solucionada para quienes tienen el poder de hacer predominar sus proyectos, es también función de la potencialidad de dar respuesta a los problemas de salud animal desde el punto de vista de otros actores sociales y demostrar superioridad, en los planos tecnológico y metodológico, frente a otras líneas de pensamiento.

La legitimación de un cuerpo de pensamiento exige, por otra parte, ocupar espacios y acumular fuerzas y también requiere un gran desarrollo metodológico y tecnológico. Esto implica tener la capacidad de asumir todo el desarrollo científico-técnico anterior, redefinirlo y levantarlo a un nivel de mayor eficacia y eficiencia, incluyendo en ella las visiones alternativas del problema.

Como se señaló, la acumulación de fuerzas estará favorecida por esa capacidad de plasmar un pensamiento más avanzado e integral sobre los problemas de salud productiva-enfermedad animal. Esto está asociado no solo por la mayor coherencia y fortaleza teórica de dicho pensamiento, sino por una capacidad técnica superior a la de las otras interpretaciones, y a una mayor capacidad de dar respuesta a los problemas de salud productiva animal, especialmente en los aspectos percibidos como relevantes por otros actores sociales, sobre todo de aquellos cuyo concurso de poder es necesario para viabilizar los proyectos valorados como importantes socialmente.

Para configurar el cuadro más probable de los escenarios donde el proceso de cambio se desarrollará es necesario inferir prospectivamente. De esta manera, podrán evaluarse las posibles modificaciones que puedan ocurrir en los distintos aspectos considerados (nivel productivo, problemas

de salud animal, factores de riesgo, estrategias de transformación).

Este enfoque supone el desarrollo de una epidemiología veterinaria con una concepción multidimensional e histórica, que contemple los escenarios productivos, económicos, sociales y políticos (6). Este campo trasciende los límites de la epidemiología y requiere de otras disciplinas que expliquen su comportamiento.

El registro y uso de informaciones relativas a los sistemas productivos, a la agroindustria, y a los indicadores de morbi-mortalidad y de la producción animal constituyen base fundamental para la construcción de los planes estratégicos y de investigación agropecuaria en el ámbito geográfico del sistema. Estos facilitan a los profesionales privados y oficiales una visión con mayor radio de acción sobre los determinantes de la producción y productividad, evitando que se concentren las operaciones en casos clínicos individuales y promocionando, a través de un esfuerzo interdisciplinario, el combate poblacional de las enfermedades infecto-contagiosas y parasitarias, y de los problemas de productividad y de rentabilidad pecuaria.

CONCLUSIONES

La nueva etapa que atraviesa la atención veterinaria en América Latina demanda un aumento de la eficiencia, tanto por parte de los servicios oficiales como del sistema de atención en su conjunto.

La promoción de la salud animal se sustentará en la capacidad que este sistema tenga para incorporar otras instituciones de importancia social, política y económica. En tal sentido, la intersectorialidad supone una compleja articulación de organismos de diversa naturaleza y funciones, instrumentados para permitir avanzar con mayor seguridad y menores costos en los propósitos definidos por los servicios.

En relación a la elaboración de planes estratégicos para las actividades agropecuarias y de salud animal, se incluyen aspectos que solo pueden ser explicados acudiendo a la biología, la estadística,

la epidemiología, la economía y la planificación. Pero esto no supone una sumatoria caótica de disciplinas. Implica un proceso dialéctico que encierra una sutil trama de combinaciones metodológicas reveladoras del carácter transdisciplinario del complejo objeto de estudio, implícito en la salud animal.

REFERENCIAS

1. ASTUDILLO, V.M., ROSENBERG, F.J., ZOTTELE, A.C., CASAS OLASCOAGA, R. Considerações sobre a saúde animal na América Latina. *Revista Veterinaria*, 9 (54): 37-43, 1990.
2. JUNTA DEL ACUERDO DE CARTAGENA. *Profundización del diseño estratégico andino*. Nov. 1990.
3. LOPEZ ACUÑA, D., ROMERO, A. Consideraciones conceptuales y metodológicas sobre la programación local en los sistemas locales de salud. En: PAGANINI, J.M., CAPOTE MIR, R. (Eds.). *Los sistemas locales de salud: conceptos, métodos, experiencias*. Washington, D.C., OPS/OMS, 1990. p.337-348. (Pub. Cien., 519).
4. MATUS, C. *Política, planificación y gobierno*. Caracas, Venezuela, 1988.
5. OBREGON, S., MONTILVA, L. La planificación situacional en los sistemas locales de salud. En: PAGANINI, J.M., CAPOTE MIR, R. (Eds.). *Los sistemas locales de salud: conceptos, métodos, experiencias*. Washington, D.C., OPS/OMS, 1990. p.349-406 (Pub. Cien., 519).
6. ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. *Programa de desarrollo de políticas de salud*. Washington, D.C., OPS/OMS, 1992. (Serie de Informes Técnicos, 13).
7. ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. *I Reunión del Comité Hemisférico para la Erradicación de la Fiebre Aftosa*. 6-7 junio 1988. Plan de Acción. Washington, D.C., OPS/OMS, 1988.
8. OSZLAK, O., BONEO, H., DE FANELLI, A.G., LLOVET, J.J., Descentralización de los sistemas de salud. En: PAGANINI, J.M., CAPOTE MIR, R. (Eds.). *Los sistemas locales de salud: conceptos, métodos, experiencias*, Washington, D.C., OPS/OMS, 1990. p. 59-81. (Pub. Cien., 519).
9. PAGANINI, J.M., CAPOTE MIR, R. (Eds.). *Los sistemas locales de salud: conceptos, métodos,*

- experiencias. Washington, D.C., OPS/OMS, 1990. 742 p. (Pub. Cien., 519).
10. SAMAJA, J. La combinación de métodos: pasos para una comprensión dialéctica del trabajo interdisciplinario. *Educ. Méd. Salud*, 26, (1): 4-34, 1992.
 11. SERRÃO, U.M., ASTUDILLO, V.M., SILVA, A.J.M., ZOTTELE, A.C. La función de los servicios veterinarios. En: *VI Congreso Fluminense de Medicina Veterinaria*. Rio de Janeiro, 18-22 de noviembre de 1990.
 12. SERRÃO, U.M., DORA, F., MUZIO, F., TAMAYO, H., ASTUDILLO, V.M., ZOTTELE, A.C. Atención veterinaria local./Local veterinary attention. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 57: 60-73, 1992.
 13. SUAREZ JIMENEZ, J. *Acción intersectorial en salud*. La Habana, Cuba, Fac. Salud Pública, Inst. Sup. Ciencias Médicas de La Habana, 1991. (Tesis de maestría./Thesis).

Anuncio

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

INTERSECTORAL AND INTERDISCIPLINARY ASPECTS IN THE LOCAL VETERINARY ATTENTION SYSTEMS

V. ASTUDILLO, A. ZOTTELE

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

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

SUMMARY. The veterinary attention systems are undergoing profound changes characterized by the producers' growing participation in various animal health campaigns, particularly in the control of foot-and-mouth disease. This process is viewed as part of the administrative decentralization of a significant number of sanitary activities. Animal-health attention and participation at the local level have become a stimulus and a necessity, enabling the institutions involved in the agricultural and livestock-raising activities to coordinate efforts to promote development. Moreover, there is a growing demand that technical personnel from the various disciplines participate more fully in the drafting and follow-through of work plans and livestock-related research plans within the system's geographic scope. Their participation should focus on dealing with the sanitary problems jointly with the aspects related to the livestock industry's productivity and profitability.

The systems of veterinary attention are defined as groups of private and public institutions that produce activities organized to act on the profiles of farm animals' health and public health. The systems materialize the specific policies through the execution of actions and services organized in accordance with the global guidelines and strategies planned in each country, and within the context of their productive and social systems (11,12).

The animal-health veterinary attention systems have diversified into three sectors: (a) official veterinary service, (b) veterinary services operated by cooperatives or by integrated production agencies, and (c) private attention.

As the alternative producing the best results in the activities involving the prevention, control

and eradication of animal diseases, recent years have favored the configuration of veterinary attention systems operating at the local level.

The initiative that the producers have assumed in various countries through their organizations plays a decisive role in this task. Likewise, the actions generated by this phenomenon promotes changes in the organizational and financial aspects, and prods the development of sanitary assistance mechanisms (vaccination, control of outbreaks and of animal transit) and of the epidemiological surveillance and information systems.

Two central aspects of this scenario are the participation of the diverse sectors directly or indirectly committed to promoting animal health, inasmuch as it depends on general determining factors (13), and the inclusion of the distinct disciplines that, from multiple methodological perspectives, explain the origin of animal health problems, their evolution, and the social and institutional mechanisms for modifying certain undesirable states.

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

STRENGTHENING OF LOCAL VETERINARY ATTENTION AND INTERSECTORAL ASPECTS

The veterinary attention systems tend to consolidate at the local level due to the impact of two converging phenomena: the crisis in the Latin American states that is materialized in their inability to generate the quantity and quality of goods and services offered in preceding decades; and, on the other hand, the perception that the centralized and vertical models of attention stifle progress in the tasks of eradicating diseases critical to the production and trade of farm animals and their by-products.

The deterioration of the public veterinary services, a characteristic of the last ten years, and their excessive degree of centralization and bureaucratization, underscored the already limited effective capacity to introduce, within the livestock-raising sector, significant modifications in animal production and health.

As an outgrowth of this situation, a fatigue was produced that has affected the sanitary labors of the personnel who render the veterinary services and dampened the motivation of the social segments related to the livestock industry.

In several countries a new concept is being developed which creates an environment of reciprocal responsibilities between the public veterinary services and the beneficiaries at the local levels. These responsibilities are viable to materialize, mobilizing all the local resources, in order for the sanitary operations to become more effective, efficient and timely, in response to the real needs of the livestock activity of the area.

To the extent that the capacity of analysis is developed, along with an understanding of the livestock-producing reality and the animal-health situation at the local level, and the services existing for the production of veterinary attention services are identified and coordinated, the way is opened to offering a greater response to the problems of animal production (9).

Proposals for technical and administrative reorientation of veterinary attention have been

formulated (7). The strengthening of the local sanitary operations and the ensuing development of social participation and of intersectoral coordination at that level have been regarded as instruments for attaining greater effectiveness in the action implemented and greater efficiency in administrative activities.

From the point of view of the state, this concept is a response to requirements to decentralize the official apparatus, in search of wider social participation and effective action. This organizational reorientation pursues a greater capability to respond, in line with geographic and populational criteria, to the changing and specific demands of livestock producers' groups affected by more or less common epidemiological problems.

In order to move ahead with this reorientation, the local mechanism of veterinary attention should have the capacity, within a given populational space, to unite all the available resources on behalf of a better animal sanitary effort.

Intersectoral animal-health action consists of the *coordinated intervention of institutions representing more than one social sector in action destined total or partially to coping with problems more related to animal health*. This action enables veterinary attention to be promoted and developed at the local level, and leads to the mobilization of financial and other kinds of resources in support of the animal-health programs.

In short, the local veterinary attention systems are sustained by the participation of the public and private institutions that yield actions to protect and improve the health of the farm animal populations. Such institutions include the livestock raisers' associations, agroindustries, universities, agricultural research institutes, professional groups, and ministries or secretariats of agriculture. But other sectors of health, education, and government, among others, are essential for the promotion of animal health. Besides, they are direct beneficiaries of the changes in the profiles of the livestock industry's development.

There are certain postulates that serve to bring about a better functioning of the management of the local system (3,5,6,8), such as: techni-

cal and administrative decentralization of the management of the resources and of the tactical and operational mechanisms; identification of the veterinary attention's priority needs and drafting of a local strategic plan; administration of health actions like vaccinations, epidemiological surveillance, transit controls, control of outbreaks, etc; and, active participation in executing and evaluating the local strategic plan.

In a scenario of national agricultural and livestock production policies, these systems necessarily tend toward integration with the sanitary programs existing for the control or eradication of animal diseases as well as with other programs involved in the livestock industry's productivity and profitability.

In this context, the universities, especially the schools of veterinary sciences or animal husbandry, possess favorable conditions for incorporating their members into the analyses of the sanitary arena. This fuses the university with the community and enhances the theoretical and practical training of its students while also providing an avenue for funding for the schools.

An updated survey of projects and agreements with national or international organizations, involving the livestock industry, and currently under development in the region, is of vital importance in identifying common objectives that may lead to integrated execution and therefore provide a savings of resources.

The regionalization of the productive systems and the channels of commercialization determine, in their social actors, interests varying according to the stages of animal-health control.

There are experiences whereby agribusiness has incorporated the requirements of sanitary policies established for the acceptance of products like milk and meat, and included in the differentiation of prices according to the health condition, in the assignment of tasks within the local system to its veterinary doctors who provide technical assistance, and in the formation of rotating funds for the acquisition of biological products (2). Also, this is the specific case of laboratories that produce pharmaceutical, chemical and biological products, the

training and promotion of the program's activities and the implementation of tests to assess their products' behavior in the field, of great importance is the contribution that the educational sector or the municipal authorities can lend to a model of animal-health promotion.

In the final instance, the processes that determine a given health profile are a response to problems that highly transcend the specific veterinary attention system (1) and, therefore, demand more complex levels of intervention which require intersectoral action.

In the local animal-production structure, the small proprietors are considered as often concerned with problems that do not always coincide with certain national strategies. Nevertheless, the simple fact of coping with the main problems affecting their production and productivity, and of giving priority to the allocation of public resources toward this sector of the population, favors greater and better participation.

The professional entities, especially the Veterinary Medical Associations make up an important piece in the gearbox of the local veterinary attention services. They contribute their own experiences in the scenario, activities useful for analysis of the health situation and the building of the given plan of strategy. This type of organization is an instrument for tightening the relationship with the social, economic and political sectors, for intervening in the conceiving of proposals for development, for expanding the demand for jobs and for establishing fees and rates for services according to costs, geographical location and type of activity.

Integration of the tasks executed by the Ministries of Health and Agriculture, through the veterinary attention services, is fundamental for a transformation of the health situation. An organization of this nature requires the availability of professionals as "health promoters" thus the importance of training personnel in this discipline and of designing training policies with this content for the national institutions and international technical cooperation agencies.

The local veterinary attention systems configure a fundamental instrument for the setting of policies and strategies in line with the field reality, the political and social organizations, the feasibility of action in harmony with the existing infrastructure, the production systems and the identified epidemiological profile. And they would contribute moreover to achieving the political support that would ensure administrative continuity of their animal health programs and their integration within the policies of development.

The local health systems demonstrate what the practice of intersectorality is and what are the results that can be expected of this process.

INTEPDISCIPLINARITY AND LOCAL VETERINARY ATTENTION

The animal-health phenomena viewed from an epidemiological standpoint are phenomena related to problems studied by the social sciences. Moreover, the social reality in all its complexity requires that it be broached with diverse theoretical, methodological and operational instruments built upon various disciplines.

The cultural, economic, political, geographic, and demographic elements must be added to the biological aspects, inasmuch as they constitute the reality in which the envisaged veterinary attention is to be developed.

The interdisciplinary aspect is implicit in the intersectoral approach, because it provides evidence that the problem of veterinary attention is more than just a problem of species susceptible to various diseases; it is fundamentally a social problem in which there are various actors with varying interests (10).

This approach is especially necessary when the problem is analyzed at the local level, because each social group with specific interests in the livestock-related economic activity has its own "way of seeing and analyzing" a specific problem, vis-à-vis its social and economic efficacy and their interests (4). Considering the explanation for the often-repeated presentation of some animal-health problems and their solutions, a confrontation of

concepts, theories, methods and techniques has been observed in Latin America; this has led to the creation of an environment of conflicts and consensuses among the social actors.

The legitimacy of a form of thought facing society, resolved for those who have the power to make their projects predominate, is also a function of the potentiality of responding to animal-health problems from the standpoint of other social actors and demonstrating superiority on the technological and methodological planes, in reply to other lines of thought.

Legitimizing a body of thought requires, on the other hand, that spaces be occupied and forces accumulated. It also necessitates substantial methodological and technological development. This in turn implies the need to have the capability of assuming all the previous scientific and technical development, redefining it, raising it to a level of greater efficacy and efficiency, and including within it the alternative views of the problem.

As indicated previously, the accumulation of forces is favored by this capability to conceive more advanced and full-range thought about the productive health-animal disease problem. This is a consequence not only of that thought's greater coherence and theoretical strength, but also of a technical capacity superior to that of the other interpretations. Also, it involves a greater capacity to respond to the problems of productive animal health, especially in the aspects perceived as relevant by other social actors, notably those whose exercise of power is needed to render feasible the projects that we value as socially important.

In order to configure the most probable scenario wherein the process of change will develop, one must engage in prospective inference. In this manner one will be able to assess the possible changes that may occur in the several aspects considered (productive level, animal-health problems, risk factors, strategies of transformation).

This approach supposes the development of a veterinary epidemiology with a multidimensional and historical outlook that contemplates the productive, economic, social and political scenarios (6). This field transcends the limits of

epidemiology and calls on other disciplines to explain its behavior.

The recording and use of information related to the productive systems, to agribusiness, to the indicators of morbidity, mortality and animal production, all constitute a fundamental basis for building the plans of strategy and plans for studying the agricultural and livestock-raising sectors within the system's geographic scope. This data provides the private and official professionals with a broader view of the factors determining production and productivity, preventing operations from being concentrated solely on individual clinical cases. Likewise, through interdisciplinary effort, it also promotes the population-level battle against infectious, contagious and parasite-caused diseases and against the problems facing productivity and profitability in the livestock industry.

CONCLUSIONS

The new phase with which veterinary attention efforts will have to cope in Latin America requires increased efficiency by both the official services and the system of attention as a whole.

The advancement of animal health will be sustained by the system's capability to incorporate other socially, politically and economically important institutions. In this sense, the intersectoral approach supposes a complex blending of entities, agencies and organizations having diverse natures and functions, but acting cohesively in pursuit of greater safety and lower costs in achieving the goals proposed by the animal-health services.

With respect to the conception of strategic plans for the animal-health and agricultural and livestock-producing industries' activities, aspects are included that can be explained only by resorting to biology, statistics, epidemiology, economics and planning. But this does not entail a chaotic hodge-podge of disciplines. Rather, it implies a dialectical process that encompasses a subtle underlying web of methodological combinations revealing the transdisciplinary character of the complex object of study, a character implicit in animal health.

REFERENCES

1. ASTUDILLO, V.M., ROSENBERG, F.J., ZOTTELE, A.C., CASAS OLASCOAGA, R. Considerações sobre a saúde animal na América Latina. *Hora Veterinaria*, 9 (54): 37-43, 1990.
2. JUNTA DEL ACUERDO DE CARTAGENA. *Profundización del diseño estratégico andino*. Nov. 1990.
3. LOPEZ ACUÑA, D., ROMERO, A. Consideraciones conceptuales y metodológicas sobre la programación local en los sistemas locales de salud. En: PAGANINI, J.M., CAPOTE MIR, R. (Eds.). *Los sistemas locales de salud: conceptos, métodos, experiencias*. Washington, D.C., OPS/OMS, 1990. p.337-348. (Pub. Cien., 519).
4. MATUS, C. *Política, planificación y gobierno*. Caracas, Venezuela, 1988.
5. OBREGON, S., MONTILVA, L. La planificación situacional en los sistemas locales de salud. En: PAGANINI, J.M., CAPOTE MIR, R. (Eds.). *Los sistemas locales de salud: conceptos, métodos, experiencias*. Washington, D.C., OPS/OMS, 1990. p.349-406 (Pub. Cien., 519).
6. ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. *Programa de desarrollo de políticas de salud*. Washington, D.C., OPS/OMS, 1992. (Serie de Informes Técnicos, 13).
7. ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. *I Reunión del Comité Hemisférico para la Erradicación de la Fiebre Aftosa*. 6-7 junio 1988. Plan de Acción. Washington, D.C., OPS/OMS, 1988.
8. OSZLAK, O., BONEO, H., DE FANELLI, A.G., LLOVET, J.J., Descentralización de los sistemas de salud. En: PAGANINI, J.M., CAPOTE MIR, R. (Eds.). *Los sistemas locales de salud: conceptos, métodos, experiencias*, Washington, D.C., OPS/OMS, 1990. p. 59-81. (Pub. Cien., 519).
9. PAGANINI, J.M., CAPOTE MIR, R. (Eds.). *Los sistemas locales de salud: conceptos, métodos, experiencias*. Washington, D.C., OPS/OMS, 1990. 742 p. (Pub. Cien., 519).
10. SAMAJA, J. La combinación de métodos: pasos para una comprensión dialéctica del trabajo interdisciplinario. *Educ. Méd. Salud*, 26, (1): 4-34, 1992.
11. SERRÃO, U.M., ASTUDILLO, V.M., SILVA, A.J.M., ZOTTELE, A.C. La función de los servicios veterinarios. En: *V Congreso Fluminense de Medicina Veterinaria*. Rio de Janeiro, 18-22 de noviembre de 1990.

12. SERRÃO, U.M., DORA, F., MUZIO, F., TAMAYO, H., ASTUDILLO, V.M., ZOTTELE, A.C. Atención veterinaria local./Local veterinary attention. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 57: 60-73, 1992.
13. SUAREZ JIMENEZ, J. *Acción intersectorial en salud*. La Habana, Cuba, Fac. Salud Pública, Inst. Sup. Ciencias Médicas de La Habana, 1991. (Tesis de maestría./Thesis).

Announcement

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

LOS CIRCUITOS DE COMERCIALIZACIÓN BOVINA COMO ELEMENTOS DE INTERVENCIÓN SANITARIA

G. M. DE MORAES

*Departamento de Inspección y Defensa Agropecuaria de
Mato Grosso do Sul (IAGRO)*

Caixa Postal 2011, 79074-460 Campo Grande, MS, Brasil.

RESUMEN. Se definen y evalúan los circuitos de comercialización bovina (CCB) como método para entender e intervenir epidemiológicamente en el espacio agropecuario. Cada CCB se define como aquel espacio geopolítico integrado por agentes que mantienen entre sí relaciones de compra y venta de animales durante un período de tiempo determinado. Considerando el municipio como unidad primaria de análisis, los CCB pueden ser identificados a partir del estudio de la dinámica del tránsito bovino, la intensidad y el predominio de la entrada y salida de animales en cada uno de ellos. Se presenta el caso de Mato Grosso do Sul, Brasil, donde se verifica, para el año 1989, la existencia de tres circuitos (Noroeste, Noreste y Sur) y 19 municipios de enlace. Esta constatación indica transformaciones en la distribución de los sistemas de producción bovina del estado y sugiere la necesidad de recharacterizar los ecosistemas de fiebre aftosa para la región. Se concluye que el tránsito de animales debe ser considerado como un indicador directo en el análisis del riesgo de transmisión de enfermedades, especialmente, en el caso de la fiebre aftosa.

La acción de los servicios de salud animal presupone, entre otros factores, una comprensión integral del espacio sobre el que ejercen influencia, siendo posible afirmar que, cuanto más preciso sea este conocimiento, mayor será su capacidad transformadora.

Un ejemplo de esta relación lo constituye la lucha contra la fiebre aftosa en América del Sur. A partir del final de la década del 70, los resultados poco alentadores obtenidos en el combate a la enfermedad estimularon la definición de los ecosistemas para la fiebre aftosa en base a la relación determinante de las formas de organización

de la producción sobre el perfil de salud animal. Apoyándose en sistemas de información que permitieron la elaboración de indicadores sobre el comportamiento de la enfermedad, la demografía animal y la estructura de producción preponderante en determinadas regiones (3, 13, 15), la definición de estos ecosistemas proporcionó a los agentes sanitarios la posibilidad de intervenir sobre el medio a través de acciones diferenciadas de acuerdo con las particularidades y los objetivos previstos en cada caso.

No obstante, las informaciones necesarias para la definición de los ecosistemas no siempre están disponibles en los servicios de salud animal, hecho que dificulta su operacionalización, principalmente en las regiones en proceso de desarrollo agropecuario.

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

El tránsito de animales ha sido reconocido históricamente como uno de los principales determinantes en la difusión de la fiebre aftosa (2, 4, 7) así como el papel destacado que tiene en los programas de combate (5, 6). En Brasil la relación directa entre el tránsito bovino y la fiebre aftosa, donde los períodos de mayor intensidad de flujo bovino se corresponden con los de incidencia más alta, ha sido evidenciada en diferentes épocas y regiones (8, 10, 11, 12, 14).

Entre las informaciones normalmente generadas durante la acción de los servicios veterinarios, el presente trabajo procura valorizar las relativas al control del tránsito bovino, proponiendo una metodología que permite una lectura complementaria del espacio agropecuario en base a los circuitos de comercialización bovina (CCB), como otra forma de orientar las acciones sanitarias, en especial, en el caso de la fiebre aftosa.

METODOLOGÍA UTILIZADA

El concepto de CCB surge en base a las relaciones de intercambio que se establecen entre los distintos agentes que integran el proceso de producción bovina y que se relacionan entre sí de forma dinámica, influenciados por factores socio-económicos, como la proximidad geográfica, presencia de mercados consumidores y valor comercial del producto en los diferentes mercados y épocas.

Un CCB puede ser definido como: aquel espacio geopolítico constituido por elementos que mantienen entre sí un cierto grado de relación (GR) de compra y venta de bovinos durante un período determinado.

Estos elementos constituyen las unidades básicas de cada circuito y son los agentes del proceso, agrupados en niveles que pueden variar de acuerdo con el objeto y los objetivos del estudio (productores individuales, municipios, etc.).

El GR expresa la intensidad del intercambio que existe entre los agentes, cuanto mayor sea el GR más cerrado e independiente será el circuito.

Cada agente mantiene un determinado GR con cada uno de los demás integrantes del circuito, así como con otros agentes que no pertenecen al mismo. De esta forma, el GR final de un CCB está representado por la proporción de GRs entre integrantes en relación al total de relaciones establecidas por cada uno de ellos:

$$\text{GR del CCB} = \frac{\Sigma \text{GR entre elementos del CCB}}{\Sigma \text{GR total de los elementos del CCB}}$$

Para este trabajo a nivel estadual, se consideró a los municipios como las unidades básicas para definir a los CCB. De esta forma, las entradas y salidas de animales de los municipios se analizan de forma independiente mediante el cálculo del grado de relación por ingresos (GRI) y el grado de relación por egresos (GRE). Para ello, se disponen los datos en los cuadros, de forma de poder obtener el total de animales entrados y salidos de cada municipio, así como las cifras parciales discriminadas por origen y destino respectivamente.

$$\text{GRI}_i = \frac{X_i}{\Sigma X_i} \times 100$$

donde:

GRI_i es el grado de relación por ingresos de un determinado municipio proveniente del municipio i ;

X_i es la cantidad de bovinos que ingresan en un determinado municipio proveniente del municipio i .

$$\text{GRE}_j = \frac{Y_j}{\Sigma Y_j} \times 100$$

donde:

GRE_j es el grado de relación por egresos de un determinado municipio con destino al municipio j ;

Y_j es la cantidad de bovinos que egresan de un determinado municipio con destino al municipio j .

Una vez que todas las relaciones establecidas por un municipio han sido cuantificadas se las dispone en forma decreciente para apreciar su importancia relativa. Resulta conveniente eliminar las inferiores a 1%, desde que la sumatoria de las restantes represente por lo menos 90% del tránsito de ingreso o egreso, porque existen altas probabilidades de ser resultado de un intercambio ocasional.

La delimitación de los CCB comienza por la selección de aquellos municipios más representativos. Un primer criterio de selección está constituido por el peso relativo que tiene cada municipio, en relación al tránsito total del estado:

$$TTM_i = \frac{DM_i + DE_i + FE_i}{\Sigma(DM_i + DE_i + FE_i)} \times 100$$

donde:

TTM_i es el porcentaje del tránsito total del municipio i ;

DM_i el tránsito total dentro del municipio (intramunicipal);

DE_i el tránsito total por ingresos o egresos del municipio i dentro del estado;

FE_i el tránsito total de municipios fuera del estado (interestadual).

En segundo lugar, entre los municipios con más altos valores de TTM se seleccionan, como referencia, aquellos que presentan menor grado de relación entre sí, GRE y GRI. Con esta base, se aglutinan primero las unidades de alto GR con los municipios de referencia, complementando esto con criterios como la proximidad geográfica y por conocimiento de la realidad local.

Esta aglutinación inicial en torno a los municipios de referencia tiene como objetivo formar los núcleos primarios que darán origen a los CCB.

La intensidad de relación inicialmente utilizada como factor aglutinante, depende del GRE y del GRI entre los municipios próximos entre sí.

Los municipios que se relacionan indistintamente con núcleos primarios diferentes o con fuerte GR con otros geográficamente distantes se denominan *municipios de enlace*. El grado de relación entre y con los municipios de enlace se denomina grado de relación de enlace (GRL).

A efectos de definir los circuitos de comercialización se siguieron los siguientes criterios:

a) situación geográfica; cada municipio debe limitar con por lo menos uno de los integrantes del núcleo primario, u otro municipio que tenga límites con este y así sucesivamente;

b) grado de relación; el valor, tanto el GRE como el GRI, debe ser superior al estipulado para el factor aglutinante;

c) el GRL puede ser utilizado para definir la participación de un municipio en determinado CCB desde que no sea mayor que el GRE o el GRI.

El GR entre los municipios integrantes de un mismo circuito se denomina grado de relación interna (GRD), mientras que el grado de relación que mantienen con municipios situados fuera del estado es llamado grado de relación fuera del estado (GRF), de modo que el grado total de relaciones (GRT) establecidas por un municipio es:

$$\begin{aligned} GRT_{\text{ingreso}} &= GRD_{\text{ingreso}} + GRL_{\text{ingreso}} + GRF_{\text{ingreso}} \\ GRT_{\text{egreso}} &= GRD_{\text{egreso}} + GRL_{\text{egreso}} + GRF_{\text{egreso}} \end{aligned}$$

El GRE y GRI de un circuito de comercialización es la media de los GRE y GRI de los municipios que lo componen:

$$GRI_{\text{CCB}} = \frac{\Sigma z_i}{\Sigma Z_j} \quad \text{y} \quad GRE_{\text{CCB}} = \frac{\Sigma w_i}{\Sigma W_j}$$

donde:

z_i = cantidad de bovinos que entran al municipio i desde los otros municipios que integran el circuito, municipios de enlace, y de fuera del estado;

Z_j = total de bovinos que ingresan al municipio i ;

w_i = cantidad de bovinos que salen del municipio i con destino a los otros municipios que integran el circuito, municipios de enlace y para fuera del estado;

W_j = total de bovinos que salen del municipio j .

El GR final de un CCB está dado por:

$$GR_{CCB} = \frac{\sum Z_i + \sum w_i}{\sum Z_j + \sum W_j}$$

EL CASO DEL ESTADO DE MATO GROSSO DO SUL, BRASIL

Con la metodología propuesta se analizó el estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. En el año de 1989 su rebaño bovino era el segundo en el Brasil con 17.732.406 animales distribuidos por todo el territorio (9). Responsable por el 29,8% del producto interno bruto del estado (1,5) presentó, en el período 1980-1990, una tasa de crecimiento anual del 4,9%, constituyendo un factor importante de desarrollo socioeconómico, con marcado predominio de las explotaciones extensivas para producción de carne con razas cebuínas y una menor proporción de establecimientos de cría semiintensivos, siendo muy reducida la cría intensiva.

Fueron utilizados los datos de tránsito correspondientes al año de 1989 siendo posible discriminar, para cada movimiento, el municipio de salida del ganado, el municipio de destino y la finalidad del movimiento (cría/recría, engorde, reproducción y frigorífico).

Se identificaron tres circuitos de comercialización denominados Noreste (NE), Noroeste (NO) y Sur (SUR) y 19 municipios de enlace (cuadros 1, 2 y figura 1). El grado de independencia entre los CCB varió entre 83,9% y 89,6%, siendo

el circuito más independiente el NE, seguido del NO y SUR.

Por su parte, el circuito SUR presenta el menor GRI, lo que indica mayor dependencia externa, siendo su principal proveedor el circuito NO. Tanto el circuito SUR como el NE se caracterizan por la salida de animales con destino principal a matanza, mientras que en el caso de NO la salida se da en dirección al mercado interno.

El tránsito interestadual se refleja en el cuadro 3, apareciendo los circuitos NE y SUR los que más animales envían para fuera del estado. El GRF representa aproximadamente la mitad del tránsito de salida del circuito NE, siendo el principal destino el estado de São Paulo, mientras que, para el circuito SUR, también con GRF elevado, el principal destino es el estado de Paraná. El GRF bajo del circuito NO, comparado a los otros dos, demuestra la tendencia al abastecimiento interno de Mato Grosso do Sul.

En cuanto a los municipios de enlace, los principales exportadores de bovinos están en la región limítrofe con São Paulo y Paraná, estados responsables por más del 90% del tránsito interestadual de Mato Grosso do Sul en 1989.

La dinámica de los CCB y municipios de enlace se puede apreciar en la figura 2. El grosor de las flechas tiene relación directa con la intensidad del tránsito.

En los municipios situados en la región límite con los estados de São Paulo y Paraná, donde la tierra tiene mayor valor, la cría de bovinos se dedicaba a las actividades de engorde mientras que en los municipios del interior, principalmente en los "pantaneros", predominaron las fases de cría y recría, demostrándose un ejemplo típico del desarrollo ganadero latinoamericano (13, 15).

En una primera instancia, la existencia de estos CCB indica una transformación en la distribución de las formas de producción bovina del estado. Históricamente, la cría de bovinos en esta región dejó de ser una actividad secundaria al objetivo principal de extracción de oro y diamantes, para transformarse en la actividad dominante, estimulada por un creciente mercado consumidor representado por las regiones sur y sureste.

Cuadro 1. Circuitos de comercialización bovina, Mato Grosso do Sul, 1989, resultados globales

CCB	N° DE MUNICIPIOS	INGRESOS		EGRESOS		GRADO DE RELACION FINAL (GR)	TRANSITO BOVINO TOTAL	
		GRI	N° BOV	GRE	N° BOV		INGRESOS	EGRESOS
Noreste	08	85,9	438645	91,6	886200	89,6	510503	967951
Sur	12	77,3	480406	88,7	763784	83,9	621700	860663
Noroeste	25	88,0	1155252	85,3	1493174	86,9	1298777	1749680
Municipios de Enlace	19	37,3	321165	59,1	719199	50,1	861934	1216193
TOTAL	64	-	2395468	-	3862357	-	3292914	4794487

GRI = Grado de relación por ingresos; GRE = Grado de relación por egresos.

Cuadro 2. Grado de relación de los circuitos de comercialización bovina y municipios de enlace, Mato Grosso do Sul, 1989

CCB	INGRESOS						EGRESOS									
	GRD	N°BOV	GRL	N°BOV	GRF	N°BOV	GRI	N°BOV	GRD	N°BOV	GRF	N°BOV	GRI	N°BOV		
NE	68,3	348609	17,6	90038	-	0	85,9	438645	35,3	341862	7,3	70719	48,9	473620	91,6	886200
SUR	50,8	315823	26,5	164584	-	0	77,3	480406	36,1	310675	12,5	107279	40,2	345833	88,7	763784
NO	77,0	999824	12,0	155432	-	0	88,0	1155252	56,8	783013	15,5	270828	12,0	210440	85,3	1493174
M.L.	-	0	37,3	32165	-	0	37,3	321165	-	0	25,3	307683	33,8	411516	59,1	719199

NE = Circuito Noreste
M.L. = Municipios de Enlace
GRF = Grado de relación fuera del estado
SUR = Circuito Sur
GRD = Grado de relación interno
GRI = Grado de relación por ingresos
NO = Circuito Noroeste;
GRL = Grado de relación de enlace;
GRE = Grado de relación por egresos.

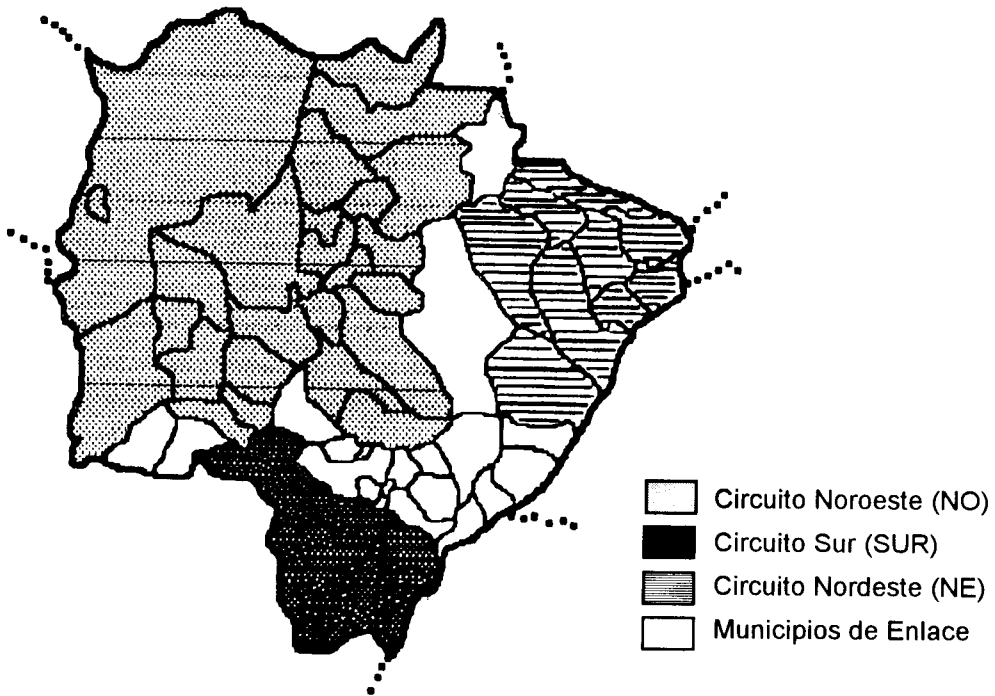


Figura 1. Circuitos de comercialización bovina y municipios de enlace, MS, 1989

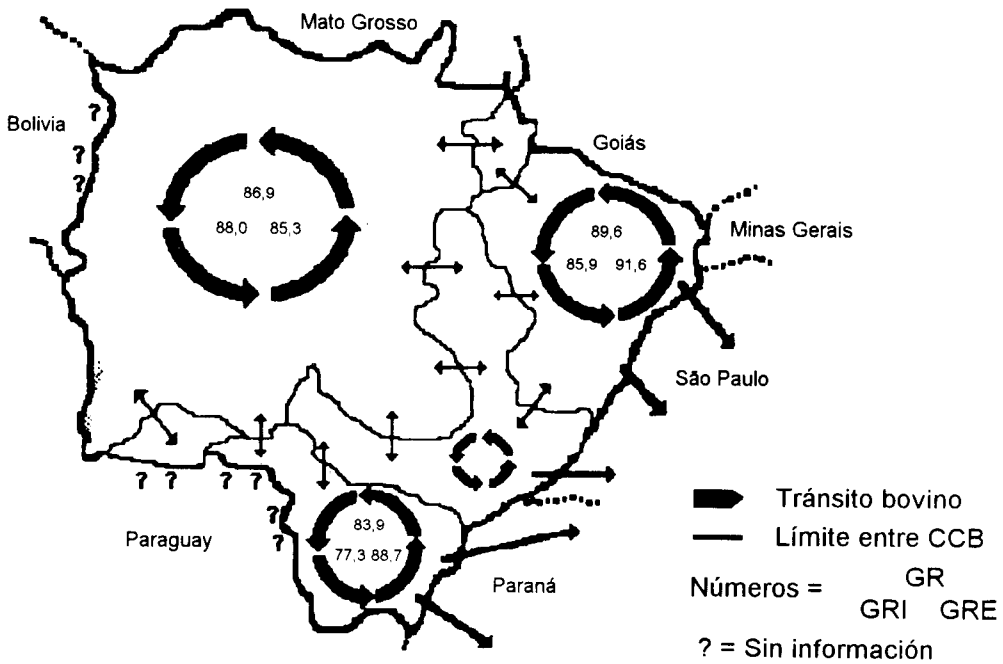


Figura 2. Dinámica del tránsito bovino de acuerdo con los CCBs, MS, 1989

Cuadro 3. Principales estados receptores de bovinos provenientes de Mato Grosso do Sul, 1989

ESTADO	NE		SUR		NO		MUNICIPIOS ENLACE		TOTAL	
	N.BOV.	%	N.BOV.	%	N.BOV.	%	N.BOV.	%	N.BOV.	%
São Paulo	441111	91,0	101947	28,7	173615	68,9	262511	61,3	979184	64,7
Paraná	12037	2,5	209622	59,1	53568	21,3	143278	33,5	418505	27,6
Santa Catarina	—	—	31589	8,9	6316	2,5	7866	1,8	45771	3,0
Goiás	12677	2,6	—	—	—	—	896	0,2	13573	0,9
Minas Gerais	7595	1,6	—	—	2054	0,8	272	0,1	9921	0,7
Mato Grosso	5648	1,2	—	—	—	—	3255	0,8	8903	0,6
TOTAL	479068	98,9	343158	96,7	249630	99,1	418078	97,7	1475857	97,5

NE = circuito noreste; SUR = circuito sur; NO = circuito noroeste

Los CCB revelaron una alteración de ese comportamiento de la distribución de la producción ganadera ya que, actualmente, la gran mayoría de los municipios se caracteriza por el ciclo completo sin predominio de ninguna de las etapas productivas. Esta alteración es consecuencia de la radicación de las agroindustrias y de la expansión y surgimiento de nuevos mercados de consumo.

Por tanto, esta transformación en la distribución de las formas de organización de la producción bovina presupone una transformación de los ecosistemas definidos para fiebre aftosa en el estado, una vez que estos estén fundamentados en la existencia y comportamiento de aquellos.

En el estado de Mato Grosso do Sul fueron definidos un ecosistema endémico en la región noroeste (Pantanal sur y municipios limítrofes) y un ecosistema epizodico en lo que resta del estado (6). Actualmente, este último está dividido en una región de alto riesgo, representado por los municipios próximos al ecosistema endémico, y una región de bajo riesgo, formado por los municipios próximos a los estados de Paraná y São Paulo. Esta definición se basa en un gradiente de

producción bovina que va desde el ecosistema endémico como proveedor de ganado para engorde al resto del estado, y posterior envío a frigorífico en las regiones noroeste de São Paulo y noreste de Paraná.

Actualmente esta relación está alterada, como lo demuestra la presencia de los CCB. Los circuitos reflejan la existencia de espacios pecuarios distintos donde la caracterización de la producción bovina y del comportamiento de la enfermedad precisan ser redefinidos. Las definiciones hasta hoy en vigor se presentan como reduccionistas, tanto para la comprensión como para la intervención sobre el problema.

CONSIDERACIONES FINALES

La metodología propuesta para el estudio del tránsito bovino, basada en el análisis de la relación origen/destino de los productos involucrados en el proceso, se mostró eficiente para la definición temporal de los distintos espacios donde se realiza la comercialización bovina.

La consolidación de los CCB para una determinada región contribuye al conocimiento necesario en el proceso de erradicación de enfermedades ya que permite ligar áreas limitadas, no por límites políticos, sino por relaciones comerciales entre los agentes participantes del proceso. Debido al carácter dinámico del proceso de producción pecuario, estos circuitos deberían ser permanentemente reevaluados como forma de evidenciar los cambios y poder direccionar las acciones sanitarias.

RECONOCIMIENTOS

Este artículo se basa en el trabajo que presenté en cumplimiento parcial de los requisitos para el título de Maestro en Medicina Veterinaria de la Universidad Federal de Minas Gerais.

Agradezco la orientación de los Profesores Celina M. Modena y Antonio Claret, Escola de Veterinária/UFMG y Olímpio Crisóstomo Ribeiro, Departamento de Inspeção e Defesa Agropecuária de Mato Grosso do Sul, y también la importante contribución de Alejandro López Inzaurrealde y Aníbal C. Zottele.

REFERENCIAS

1. ANUÁRIO ESTATÍSTICO DE MATO GROSSO DO SUL, 1990. Campo Grande, MS, Brasil, Sec. Estadual de Planejamento, Ciência e Tecnologia, 1991. v.5. 1925 p.
2. ARAMBURU, H. G. et al. Presente y futuro de la fiebre aftosa en la Argentina. *Revista de Medicina Veterinária*, Buenos Aires, 70 (5-6): 209-221, 1989.
3. ASTUDILLO, V. M. Formas de organização da produção como determinantes de risco de fiebre aftosa. *A Hora Veterinária*, 3 (17): 11-20, 1984.
4. BACHRACH, H. L. Fiebre aftosa. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 7: 1-38, 1972.
5. BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria de Defesa Sanitaria Animal. Plano Nacional de controle e erradicação da febre aftosa: etapa II. Brasília, DF. MARA/SDSA. 1980. 201 p.
6. BRASIL. Ministério de Agricultura e Reforma Agrária. Serviço de Planejamento. Projeto de combate à febre aftosa: etapa I. Brasília, DF, MARA, Sec. Planej., 1968. 262 p.
7. BROOKSBY, J.B. La fiebre aftosa: un problema mundial. *Bol. Ofic. Sanit. Panam.*, 64 (5): 377-385, 1968.
8. HUGH-JONES, M., KEARNEY, M., CASAS OLASCOAGA, R., NESTI, A. A preliminary study on stock movements and the incidence of bovine foot and mouth disease in the State of São Paulo, Brazil, during 1975 and 1976. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 2 (4): p. 1039-1047, 1983.
9. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa da pecuária municipal. Mato Grosso do Sul, 1989. Rio de Janeiro, IBGE.
10. MALAGA, H. Observaciones sobre el riesgo de ocurrencia de fiebre aftosa./Observations on the risk of occurrence of foot-and-mouth disease. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 23-24: p. 51-66, 1976.
11. MARTINS, C. *Caracterização epidemiológica da febre aftosa no espaço catarinense*. Belo Horizonte, MG, Brasil, Escola de Veterinária/UFMG, 1984. 122 p. (Tese Mestrado en Medicina Veterinaria).
12. MATHIAS, L. A. *Susceptibilidade a febre aftosa en bovinos procedentes do Pantanal Mato-grossense*. Belo Horizonte, MG, Brasil, Escola de Veterinária/UFMG, 1980. (Tese Mestrado).
13. OBIAGA, J. A., ROSENBERG, F. J., ASTUDILLO, V. M., GOIC, M. R. Las características de la producción pecuaria como determinantes de los ecosistemas de fiebre aftosa./Characteristics of livestock production as determinant of foot-and-mouth disease ecosystems. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 33-34: 33-52, 1979.
14. PEREIRA, P. L. L. *Estudo do comportamento epidemiológico da febre aftosa no contexto pecuário do Triângulo Mineiro, MG*. Belo Horizonte, MG, Brasil, Escola de Veterinária/UFMG, 1986. 80 p. (Tese Mestrado).
15. ROSENBERG, F. J. Estructura social y epidemiología veterinaria en América Latina./Social structure and veterinary epidemiology in Latin America. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 52: 3-46, 1986.

THE BOVINE COMMERCIALIZATION CIRCUITS AS ELEMENTS OF SANITARY INTERVENTION

G.M. DE MORAES

*Departamento de Inspeção y Defesa Agropecuária de
Mato Grosso do Sul (LAGRO)*

P.O. Box 2011, 79074-460 Campo Grande, MS, Brazil

SUMMARY. The bovine commercialization circuits (CCB) are defined and assessed as a method to understand and epidemiologically intervene in the agricultural and livestock-producing space. Each CCB is defined as that geopolitical space containing agents that maintain mutual relationships of buying and selling animals during a determined period of time. Considering the municipality as the primary unit of analysis, the CCBs may be identified from a study of the dynamics of bovine animal transit, the intensity and predominance of animal entry and exit in each one of them. The case of Brazil's state of Mato Grosso do Sul is examined for the year 1989, yielding the existence of three circuits (Northwest, Northeast and South) and 19 linking municipalities. The results indicate transformations in the distribution of the state's bovine production systems and suggests the need to redefine the foot-and-mouth disease ecosystems in the region. It is concluded that animal transit should be considered as a direct indicator in the analysis of the risk of disease transmission, especially in the case of foot-and-mouth disease.

The action of the animal-health services presupposes, among other factors, a full understanding of the space over which they exercise influence; one may even affirm that the more precise the knowledge, the greater will be their capability to transform the situation.

The struggle against foot-and-mouth disease in South America is an example of this relationship. From the end of the 1970's on, the few encouraging results achieved in fighting the disease stimulated efforts to define the foot-and-mouth disease ecosystems based on the determining relationship between the organizational forms of production and the animal-health profile. Sup-

ported by information systems that led to the determination of indicators of the disease's behavior, animal demography and the production structure preponderant in certain regions (3, 13, 15), the definition of these ecosystems afforded health agents the possibility of intervening in the environment by means of differentiated actions according to the particularities and objectives envisaged in each case.

However, the information needed for defining the ecosystems is not always available in the animal-health services; this situation makes operationalization difficult, especially in the regions undergoing agricultural and livestock-raising development.

The transit of animals has been historically recognized as one of the main determinants in the spread of foot-and-mouth disease (2, 4, 7), as well as being a major factor in the anti-foot-and-mouth

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

disease programs (5,6). In Brazil, the direct relationship between cattle transit and foot-and-mouth disease, where the periods of greatest cattle movements coincide with the periods of highest disease incidence, has been evidenced in different times and regions (8,10,11,12,14).

Among the information normally generated during the action of the veterinary services, this study is intended to enhance the data on bovine transit control; it proposes a methodology that provides a complementary reading of the agricultural and livestock-production space based on the bovine commercialization circuits (CCB) as another form of orienting animal-health actions, especially in the case of foot-and-mouth disease.

METHODOLOGY UTILIZED

The CCB concept emerges as a function of the interchange relationships established among the various agents composing the bovine production process, and which are dynamically interrelated and influenced by socioeconomic factors such as geographic proximity, presence of consumer markets and commercial value of the product in the different markets and times.

A CCB may be defined as: that geopolitical space constituted of elements that mutually maintain a certain degree of relationship (GR) in the buying and selling of bovines during a given period.

These elements constitute the basic units of each circuit; they are the agents of the process, grouped in levels that may vary according to the object and the objectives of the study (individual producers, municipalities, etc.).

The GR expresses the intensity of the interchange that exists among the agents; the greater the GR, the more closed and independent will be the circuit.

Each agent maintains a certain GR with each of the other members of the circuit, and with other agents not belonging to the circuit. Thus the final GR of a CCB is represented by the number of GRs among members over the total of relationships established by each one of them:

$$\text{GR of the CCB} = \frac{\Sigma \text{GR between elements of the CCB}}{\Sigma \text{Total GR of the elements of the CCB}}$$

For the purpose of conducting this study at the state level, the municipalities were regarded as the basic units in defining the CCBs. The entries and exits of animals into and from the municipalities are therefore analyzed in an independent manner by calculating the degree of relationship established on the basis of "inbound animals" (GRI) and the degree of relationship established on the basis of "outbound animals" (GRE). To this end the data are shown on the tables in order to obtain the total of animals entering into or exiting from each municipality, and the partial numbers classified by origin and destination, respectively.

$$\text{GRI}_i = \frac{X_i}{\Sigma X_i} \times 100$$

where:

GRI_i is the degree of relationship by entries from a determined municipality coming from municipality i ;

X_i is the number of cattle entering a determined municipality from municipality i .

$$\text{GRE}_j = \frac{Y_j}{\Sigma Y_j} \times 100$$

where:

GRE_j is the degree of relationship by exit from a determined municipality towards municipality j ;

Y_j number of animals outbounded from a determined municipality towards municipality j .

When all the relationships established by a municipality have been quantified they are arranged in decreasing order for an assessment of their relative importance. Those under 1% should be eliminated because it is highly probable that

they are the result of only occasional interchange, provided that the sum of the remainder represent at least 90% of the inbound and outbound transit.

The delimitation of the CCBs begins with the selection of the most representative municipalities. A primary criterion of selection is the relative weight that each municipality has in relation to the total transit in the state:

$$TTM_i = \frac{DM_i + DE_i + FE_i}{\Sigma(DM_i + DE_i + FE_i)} \times 100$$

where:

TTM_i is the percentage of total transit in municipality i ;

DM_i total transit in the municipality (intramunicipal)

DE_i total transit by entries and exits for municipality i within the state;

FE_i total transit of the municipalities outside the state (interstate).

Secondly, among the municipalities having the highest TTM values, those showing lower degrees of GRE and GRI relationships between each other are selected as references. On this basis, the high GR units are first grouped with the reference municipalities, and this is complemented with criteria like geographic proximity and other information on the local reality.

The objective of this initial grouping around the reference municipalities is to form the primary nuclei that will originate the CCBs. The intensity of the relationship initially utilized as the grouping factor depends on the GRE and GRI between the municipalities close to each other.

The municipalities that interact indistinctly with different primary nuclei or that have a strong GR with others geographically distant are called *linking municipalities*. The degree of relationship between and with the linking municipalities is referred to as the degree of linking relationship (GRL).

The following criteria were used to define the commercialization circuits:

(a) geographical location: each municipality should border with at least one of the members of the primary nucleus, or with another municipality limiting on the primary nucleus, and so on, successively;

(b) degree of relationship: the value of the GRE and GRI should be higher than the value stipulated for the grouping factor;

(c) the GRL may be utilized to define the participation of a municipality in a given CCB provided that it is not higher than the GRE or GRI.

The GR for the municipalities within a given circuit is called the degree of internal relationship (GRD), while the degree of relationship that they have with municipalities located outside the state is called "degree of out-of-state relationship" (GRF). Therefore, the total degree of relationships (GRT) established by a municipality is:

$$\begin{aligned} GRT_{inbound} &= GRD_{inbound} + GRL_{inbound} + GRF_{inbound} \\ GRT_{outbound} &= GRD_{outbound} + GRL_{outbound} + GRF_{outbound} \end{aligned}$$

The GRE and GRI of a commercialization circuit is the mean of the GRE and GRI of the municipalities that compose it:

$$GRI_{CCB} = \frac{\Sigma z_i}{\Sigma Z_j} \quad \text{and} \quad GRE_{CCB} = \frac{\Sigma w_i}{\Sigma W_j}$$

where:

z_i = number of cattle entering the municipality i from other municipalities in the circuit, from linking municipalities, and from out of state;

Z_j = total of cattle entering municipality j ;

w_i = number of cattle exiting from municipality i bound to other municipalities in the circuit, to linking municipalities, and to out of the state areas;

W_j = total of cattle exiting from municipality j .

The final GR of a CCB is given as:

$$GR_{CCB} = \frac{\sum z_i + \sum w_i}{\sum Z_j + \sum W_j}$$

THE CASE OF THE STATE OF MATO GROSSO DO SUL, BRAZIL

The proposed methodology was used to analyze the state of Mato Grosso do Sul, Brazil, for the year of 1989. Its bovine herd of 17,732,406 head was Brazil's second largest that year (9). Accounting for 29.8% of the state's gross internal product (1,5), it grew from 1980 to 1990 at an annual rate of 4.9%. The livestock industry is an important factor in socioeconomic development in the state, with a predominance of extensive open-range beef production with zebu breeds, a smaller number of semi-intensive establishments, and a very small percentage of intensive or feedlot properties.

Transit data for 1989 were used. It was possible to determine, for each movement, the municipality from which the animals exited, the municipality which they entered, and the purpose of the transit (breeding, grazing, fattening, reproduction and slaughter).

Three commercialization circuits were identified, called the Northeast (NE), Northwest (NO) and South (SUR) circuits, as well as 19 linking municipalities (tables 1, 2, and figure 1). The degree of independence among the CCBs varied from 83.9% to 89.6%; the most independent circuit was the NE, followed by NO and then SUR.

The SUR circuit showed the lowest GRI, which indicates higher external dependence, and the NO circuit was the principal supplier. The SUR and NE circuits are both characterized by the exiting of animals bound for slaughter, while the animals exiting in the NO circuit are bound for the internal market.

Interstate transit is shown in table 3, which indicates that the NE and SUR circuits are those which route most of the animals out of the state. The GRF represents approximately half of the

outbound transit of circuit NE, with São Paulo as the main destination state. For circuit SUR, also showing a high GRF, the main destination is the state of Paraná. The low GRF of the NO circuit, when compared to the other two circuits, shows the internal supply tendency of the state of Mato Grosso do Sul.

With regard to the linking municipalities, the main bovine exporters are in the region bordering São Paulo and Paraná, states that accounted for more than 90% of the interstate transit from Mato Grosso do Sul in 1989.

The dynamics of the CCBs and linking municipalities can be appreciated in figure 2, where the thickness of the arrows reflects the intensity of the transit.

In the municipalities bordering the states of São Paulo and Paraná, where the value of land is higher, it was mostly used for fattening and finishing-out purposes. But the municipalities farther inland, mainly those located in the "pantanal" region, were predominantly dedicated to the breeding, calving and prefattening stages. This example is typical of livestock development in Latin America (13,15).

In the first instance the existence of these CCBs indicates a transformation in the distribution of the state's cattle production forms. Historically, cattleraising in this region was an activity secondary to the main objectives of gold and diamond mining, but has since become the dominant economic activity. The stimulus was the growing consumer market in the south and southeastern regions.

The CCBs have revealed a change in the behavior of the distribution of the livestock-production organization in the state. Presently, the great majority of the municipalities is characterized by the complete livestock-production cycle, without predominance of any single one of the production stages. This overall change is a consequence of the fact that agribusiness has moved into the interior while new consumer markets have emerged and/or expanded.

Consequently, this transformation in the distribution of the ways of organizing the bovine production implies a transformation in the ecosys-

Table 1. Bovine commercialization circuits, Mato Grosso do Sul, 1989. Overall results

CCB	Nr of municipalities	Inbound		Outbound		Degree of final relationship (GR)		Total bov. transit	
		GRI	HEAD	GRE	HEAD	Inbound	Outbound	Inbound	Outbound
Northeast	08	85.9	438645	91.6	886200	89.6		510503	967951
South	12	77.3	480406	88.7	763784	83.9		621700	860663
Northeast	25	88.0	1155252	85.3	1493174	86.9		1298777	1749680
Linking Municipalities	19	37.3	321165	59.1	719199	50.1		861934	1216193
TOTAL	64	-	2395468	-	3862357	-		3292914	4794487

GRI = Degree of relationship by inbound; GRE = Degree of relationship by outbound.

Table 2. Degree of relationship of the bovine commercialization circuits and linking municipalities, Mato Grosso do Sul, 1989

CCB	Inbound						Outbound									
	GRD	HEAD	GRL	HEAD	GRF	HEAD	GRI	HEAD	GRD	HEAD	GRL	HEAD	GRF	HEAD	GRI	HEAD
NO	68,3	348609	17,6	90038	-	0	85,9	438645	35,3	341862	7,3	70719	48,9	473620	91,6	886200
SUR	50,8	315823	26,5	164584	-	0	77,3	480406	36,1	310675	12,5	107279	40,2	345833	88,7	763784
NE	77,0	999824	12,0	155432	-	0	88,0	1155252	56,8	783013	15,5	270828	12,0	210440	85,3	1493174
L.M.	-	0	37,3	32165	-	0	37,3	321165	-	0	25,3	307683	33,8	411516	59,1	719199

NE = Northeast Circuit SUR = South Circuit NO = Northwest Circuit
 L.M. = Linking Municipalities GRD = Degree of internal relationship GR = Degree of linking relationship
 GRF = Degree of out-of-state relationship GRI = Degree of relationship, by inbound animals GRE = Degree of relationship, by outbound (exiting) animals

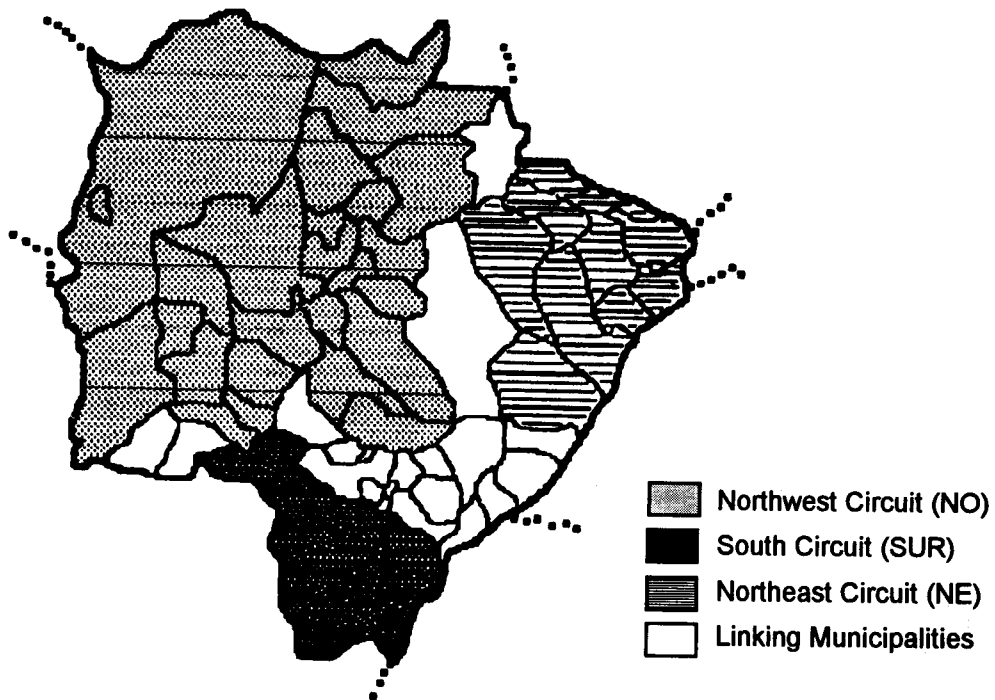


Figure 1. Bovine commercialization circuits and linking municipalities. Mato Grosso do Sul, 1989

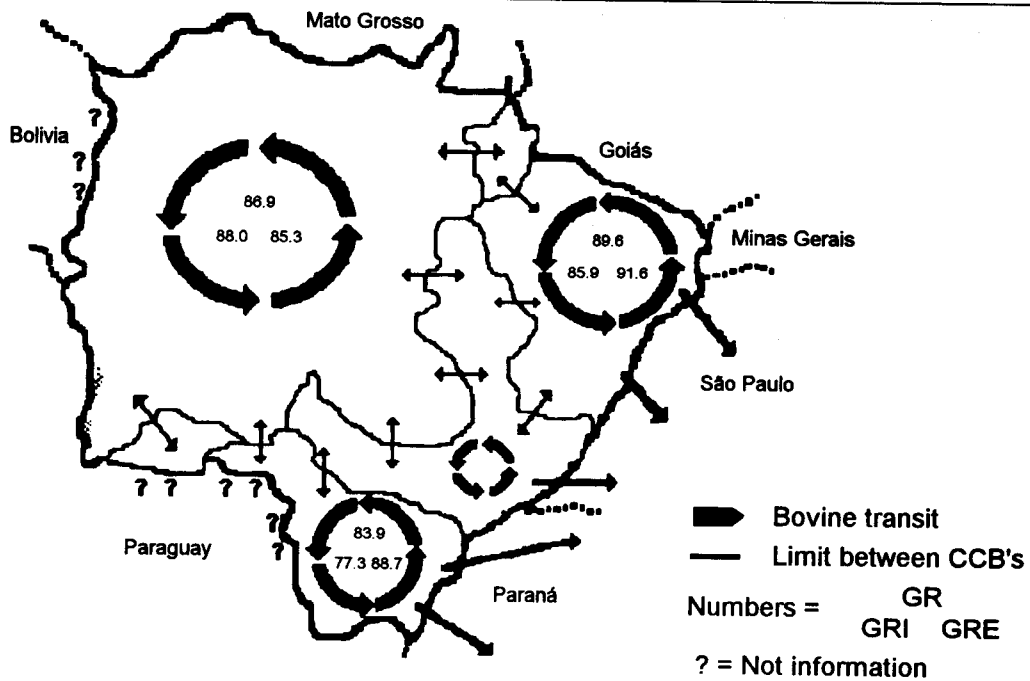


Figure 2. Dynamics of Bovine Transit according to the CCBs. Mato Grosso do Sul, 1989

Table 3. Main states receiving cattle produced in Mato Grosso do Sul, 1989

State	NE		SUR		NO		Linking municipalities		Total	
	Head	%	Head	%	Head	%	Head	%	Head	%
São Paulo	441111	91.0	101947	28.7	173615	68.9	262511	61.3	979184	64.7
Paraná	12037	2.5	209622	59.1	53568	21.3	143278	33.5	418505	27.6
Santa Catarina	—	—	31589	8.9	6316	2.5	7866	1.8	45771	3.0
Goiás	12677	2.6	—	—	—	—	896	0.2	13573	0.9
Minas Gerais	7595	1.6	—	—	2054	0.8	272	0.1	9921	0.7
Mato Grosso	5648	1.2	—	—	—	—	3255	0.8	8903	0.6
TOTAL	479068	98.9	343158	96.7	249630	99.1	418078	97.7	1475857	97.5

NE = Northeast Circuit; SUR = South Circuit; NO = Northwest Circuit

tems defined for foot-and-mouth disease in the state, once these are based in the existence and behavior of the primer.

Studies of the State of Mato Grosso do Sul led to the identification of an endemic ecosystem in the northwestern region (southern Pantanal and bordering municipalities) and of an epideemic ecosystem in the rest of the state (6). Presently, the latter ecosystem is divided into a high-risk region represented by the municipalities near the endemic ecosystem, and a low-risk region comprising the municipalities near the states of Paraná and São Paulo. This definition is based on a bovine production gradient that extends from the endemic ecosystem as a provider of cattle for fattening to the rest of the state, and later forwarding to slaughter in the northwestern region of São Paulo and northeastern region of Paraná.

As the CCBs have demonstrated, this relationship has been changed. The circuits reflect the existence of distinct livestock-production spaces wherein the characterization of cattle production and of the disease's behavior should be reanalyzed and redefined. The definitions in use up to the

present are seen nowadays as "reductionist" for both understanding and intervention in the problem.

FINAL REMARKS

The methodology proposed for the study of bovine transit, based on an analysis of the source/destination relationship of the products involved in the process, was shown to be efficient for a temporal definition of the distinct spaces wherein the commercialization of bovines is conducted.

The consolidation of the CCBs for a given region contributes to the knowledge required in the process of disease eradication; it enables students of the subject to link areas limited not by political limits but rather by commercial relationships among the agents participating in the process. Due to the dynamic character of the livestock-production process, these circuits should be continually studied and reassessed as a way of discovering and evidencing the changes and enabling health action to be effectively directed.

ACKNOWLEDGEMENTS

This article is based on a work I presented in partial fulfillment of the requirements for the degree of Mestre em Medicina Veterinária at the Federal University of Minas Gerais. It was carried out under the guidance of Professors Celina M. Modena and Antônio Claret, Escola de Veterinária/UFMG, and Dr. Olimpio Crisóstomo Ribeiro, Departamento de Inspeção e Defesa Agropecuária de Mato Grosso do Sul for which I am very grateful. I also appreciate the important contribution of Alejandro López Inzaurrealde and Aníbal C. Zottele.

REFERENCES

1. ANUÁRIO ESTATÍSTICO DE MATO GROSSO DO SUL, 1990. Campo Grande, MS, Brasil, Sec. Estadual de Planejamento, Ciência e Tecnologia, 1991. v.5. 1925 p.
2. ARAMBURU, H. G. et al. Presente y futuro de la fiebre aftosa en la Argentina. *Revista de Medicina Veterinaria*, Buenos Aires, 70(5-6): 209-221, 1989.
3. ASTUDILLO, V. M. Formas de organização da produção como determinantes de risco de febre aftosa. *A Hora Veterinária*, 3 (17): 11-20, 1984.
4. BACHRACH, H. L. Fiebre aftosa. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 7: 1-38, 1972.
5. BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria de Defesa Sanitaria Animal. Plano Nacional de controle e erradicação da febre aftosa: etapa II. Brasília, DF. MARA/SDSA. 1980. 201 p.
6. BRASIL. Ministério de Agricultura e Reforma Agrária. Serviço de Planejamento. Projeto de combate à febre aftosa: etapa 1. Brasília, DF, MARA, Sec. Planej., 1968. 262 p.
7. BROOKSBY, J.B. La fiebre aftosa: un problema mundial. *Bol. Ofic. Sanit. Panam.*, 64 (5): 377-385, 1968.
8. HUGH-JONES, M., KEARNEY, M., CASAS OLASCOAGA, R., NESTI, A. A preliminary study on stock movements and the incidence of bovine foot and mouth disease in the State of São Paulo, Brazil, during 1975 and 1976. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 2 (4): p. 1039-1047, 1983.
9. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa da pecuária municipal. Mato Grosso do Sul, 1989. Rio de Janeiro, IBGE.
10. MALAGA, H. Observaciones sobre el riesgo de ocurrencia de fiebre aftosa./Observations on the risk of occurrence of foot-and-mouth disease. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 23-24: p. 51-66, 1976.
11. MARTINS, C. *Caracterização epidemiológica da febre aftosa no espaço catarinense*. Belo Horizonte, MG, Brasil, Escola de Veterinária/UFMG, 1984. 122 p. (Tese Mestrado em Medicina Veterinaria).
12. MATHIAS, L. A. *Susceptibilidade a febre aftosa en bovinos procedentes do Pantanal Mato-grossense*. Belo Horizonte, MG, Brasil, Escola de Veterinária/UFMG, 1980. (Tese Mestrado).
13. OBIAGA, J.A., ROSENBERG, F.J., ASTUDILLO, V.M., GOIC, M.R. Las características de la producción pecuaria como determinantes de los ecosistemas de fiebre aftosa./Characteristics of livestock production as determinant of foot-and-mouth disease ecosystems. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 33-34: 33-52, 1979.
14. PEREIRA, P. L. L. *Estudo do comportamento epidemiológico da febre aftosa no contexto pecuário do Triângulo Mineiro, MG*. Belo Horizonte, MG, Brasil, Escola de Veterinária/UFMG, 1986. 80 p. (Tese Mestrado).
15. ROSENBERG, F.J. Estructura social y epidemiologia veterinaria en América Latina./Social structure and veterinary epidemiology in Latin America. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 52: 3-46, 1986.

LA PRODUCCIÓN FAMILIAR Y LAS ESTRATEGIAS DE SALUD ANIMAL

A. ZOTTELE¹, H. TAMAYO², S. BRIEVA³, L. IRIARTE³

¹*Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS)*

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

²*Oficina Sanitaria Panamericana (OPS/OMS)*

Av. Naciones Unidas, 1204 e Iñaquito,

Ed. del Club de Leones 4º piso, Quito, Ecuador

³*Facultad de Ciencias Agrarias, Univ. Nac. de Mar del Plata*

CC. 276, Ruta 226, Mar del Plata, Argentina

RESUMEN. Los programas de erradicación de la fiebre aftosa se encuentran en fase avanzada en varios países de América del Sur. Asimismo, otras regiones del continente libres de la enfermedad desarrollan actividades de prevención, imprescindibles para evitar la introducción del virus. En ambas situaciones existe un amplio sector de tenedores de ganado, caracterizados genéricamente como pequeños productores. Ellos han acompañado en buena medida el esfuerzo continental por eliminar este flagelo. Sin embargo, la prevención y erradicación de la fiebre aftosa se sustentará en bases débiles si no se estimula una participación más activa de estos productores. Para tal fin, es preciso que los programas de fiebre aftosa se incorporen como un componente más en el conjunto de las actividades de desarrollo previstas para ese sector. Esta perspectiva demanda un mayor conocimiento sobre las características de las producciones familiares pecuarias en el continente y el curso de las políticas institucionales implementadas para el sector.

Después de un extenso período en el que predominó una concepción del Estado como regulador principal de las actividades económicas y sociales, los fundamentos de esa función han sido reconsiderados. El déficit fiscal y la ineficiencia en el uso de los recursos, entre otros factores, contribuyeron al descrédito de ciertas actividades públicas y a los periódicos procesos inflacionarios, con sus secuelas de especulación y problemas de cálculo económico para la inversión y el gasto.

Estos hechos debilitaron la capacidad de respuesta a los distintos problemas sectoriales. En particular, el deterioro de los servicios públicos de atención veterinaria, su excesivo grado de centralización y burocratización acentuaron la limitada capacidad efectiva de introducir, en el medio pecuario, modificaciones significativas sobre el comportamiento de los perfiles de salud y producción animal.

El consenso sobre las ventajas del sector público en la orientación del desarrollo cedió lugar, frente a los modelos que proponen la liberación de mercados y la privatización de empresas estatales, como palancas para ese desarrollo. Como parte de las propuestas neoliberales, las políticas

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

económicas estimularon la drástica disminución de las funciones del Estado como generador de bienes y servicios. Una consecuencia de esta situación fue la restricción de recursos, que afectó tanto el trabajo sanitario de los prestadores de servicios de atención veterinaria, como la motivación de los segmentos sociales vinculados a la ganadería.

Sin embargo, a medida que algunas regiones desarrollaron la capacidad de análisis y comprensión de la realidad ganadera y de la situación de la salud animal en el nivel local, se identificaron y coordinaron los recursos existentes para producir servicios de atención veterinaria, abriendo la posibilidad de ofrecer una mejor respuesta a los problemas de la producción animal.

Las nuevas situaciones demandan con urgencia que se incorporen alternativas para los pequeños productores, considerando sus expectativas y potencialidades, lo que por otra parte, es un requisito para aumentar su participación. (8,9).

En este contexto, aparecen cinco campos de acción relacionados con el mejoramiento de los perfiles de salud animal en áreas familiares de producción:

- promover la salud en el desarrollo mediante la cooperación al fomento ganadero en los sectores familiares de producción;

- impulsar la reforma del sector mediante procesos de descentralización técnica, administrativa y financiera de los Servicios Sanitarios Oficiales, que permitan la integración de los productores en los denominados Sistemas Locales de Atención Veterinaria;

- promover la salud a partir de la concepción de que los programas de salud animal constituyen un puente entre la agricultura y la salud pública;

- estimular la protección y desarrollo ambiental asociados al mejoramiento de los perfiles de producción animal, en áreas de pequeños propietarios;

- apoyar el control de enfermedades en la población animal que afectan a la producción pecuaria y a la salud pública.

En esa línea de ideas, dos temas serán tratados en este trabajo. En primer lugar, se caracterizará la producción familiar o la pequeña producción y su

rol estratégico en las sociedades latinoamericanas y, en segundo término, se presentarán sugerencias sobre un enfoque participativo para afrontar los cambios en el perfil de salud animal en las explotaciones familiares.

CARACTERIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN FAMILIAR

La agricultura familiar

La agricultura familiar de América Latina tiene diferentes características en virtud de las variadas circunstancias histórico-sociales de las etapas que surgen, tanto de la configuración de las culturas precolombinas como de los posteriores procesos de colonización.

La denominación de productores familiares abarca realidades diferentes como la de los minifundistas, agricultores campesinos, pequeños productores, productores familiares, colonos, medieros y otros. Mas allá de las diferencias entre estos sectores sociales, existen rasgos comunes a todos ellos, tales como la escasez del recurso tierra y capital y el carácter familiar del trabajo.

Algunos aspectos referidos a su heterogeneidad se expresan en diferencias significativas respecto al ritmo de adopciones e innovaciones tecnológicas, en el nivel de productividad y en los ingresos. Hay también diferencias en el nivel de educación formal, no formal e informal, así como en el acceso al crédito institucional (1).

Las diferencias indicadas se verifican entre países y entre microregiones dentro de un país, y dentro de una misma microregión. La imagen de una agricultura campesina uniformemente pobre, tecnológicamente tradicional, analfabeta, aislada del mercado y sin acceso a los servicios del Estado, no siempre corresponde a la realidad de estos países (5).

Las explotaciones familiares materializan los nexos de integración familiar y comunitaria en el proceso productivo, mediante la aplicación de prácticas tradicionales basadas en la incorporación de la fuerza de trabajo familiar. Estas eventualmente pueden complementarse con mano de obra asalariada.

Se encuentran distribuidas en todo el continente, dedicándose en vastas áreas a la producción pecuaria. Se caracterizan por ser una importante fuente de abastecimiento del mercado interno y por el gran número de familias que dependen de esa actividad (10). Así, en Ecuador se estima que existen dos millones de campesinos minifundistas que producen entre el 41 y 63% de diez alimentos básicos de la dieta familiar (15).

El número de pobres en el agro latinoamericano se ha incrementado desde 1970 alcanzando, según las estimaciones de FAO, las dos terceras partes de la población rural, que comprende aproximadamente a 126 millones de personas. El estudio de CEPAL/PNUD estima que el número absoluto de pobres aumentó entre 1980 y 1989 en 89 millones de personas (13).

Los pequeños productores tienden a optimizar sus ingresos y orientan su producción mayoritariamente al autoconsumo o al consumo interno, aunque existen algunos sectores minoritarios que producen con una racionalidad económica de maximización de la rentabilidad y se encuentran en condiciones de incorporar mayor tecnología.

Objetivos de la producción familiar

La pequeña producción pecuaria, organizada a partir de la unidad familiar, facilita una mayor disponibilidad de alimentos para las familias y disponibilidad de recursos en la medida que logra aumentar la productividad y los ingresos (4).

La unidad familiar campesina a la vez que una unidad de producción es una unidad de consumo. Una parte significativa de su producción se destina al autoconsumo y la otra al intercambio. Por ello las decisiones de producción y consumo la toma de manera simultánea (12).

En estas unidades resulta difícil separar la actividad doméstica de la productiva. En tal sentido, la primera se conforma con un conjunto de productos destinados al consumo directo o autoconsumo familiar que satisfacen una parte de sus necesidades, en tanto la segunda, constituida por el excedente sobre ese autoconsumo, se destina a la adquisición

de otros bienes que aseguren la continuidad de esa unidad productiva.

La unidad de producción se relaciona con el mercado de productos a través del componente de producción excedente, e ingresa a un circuito comercial regido por leyes económicas que responden a la lógica de las economías empresariales. También se relaciona con el mercado de trabajo, cuando la mano de obra familiar no encuentra aplicación en la unidad productiva campesina y debe procurar emplearse fuera de la misma.

Para comprender el comportamiento económico de las unidades familiares es necesario establecer un postulado acerca del conjunto de objetivos que persigue y que guían sus acciones. Los economistas neoclásicos han caracterizado a las economías familiares como renuentes al cambio y conservadoras. En realidad, estas economías tienen un comportamiento económico que se caracteriza por una gran aversión al riesgo, fundada en el hecho de afrontar mayores riesgos ante la inestabilidad de los precios del mercado y su condición de pobres. Es así que diversifican su producción y poseen una respuesta relativa a los estímulos económicos, por ejemplo, ante una baja de precios de sus productos incrementan la oferta a costa de una sobreexplotación de la mano de obra familiar.

Debido a que la racionalidad económica de una unidad surge como respuesta al contexto en el que ella opera, describirlo es esencial para entender las condiciones de incertidumbre que enfrenta en la producción y en el intercambio. La pobre dotación de recursos en cantidad y calidad, lleva a la unidad familiar campesina a una conducta caracterizada por la aversión al riesgo. Es decir, busca minimizar riesgos, optando por sacrificar un pequeño ingreso promedio adicional a la posibilidad de una gran pérdida en su ingreso.

La racionalidad de la minimización de riesgos implica que la unidad familiar busca asegurar un nivel mínimo de ingresos. Dada su pobreza, no está en condiciones de poner a juego su supervivencia realizando actividades de alto riesgo.

Su producción es diversificada y no especializada. Una consecuencia empírica del postulado

de aversión al riesgo es que la unidad maneja un esquema diversificado de actividades y, por lo tanto, de recursos.

Estas economías presentan una gran debilidad ante la composición de su oferta que se encuentra dispersa, atomizada y diversificada, necesitando de desprenderse de su producción rápidamente e incluso antes de sus zafras (cosechas) para continuar con el ciclo productivo. A todo esto se suma la casi inexistente organización de productores que defiendan sus intereses.

Otra consecuencia es que la respuesta de la unidad familiar a cambios de incentivos económicos no es muy clara, ni inmediata. Bajo condiciones de incertidumbre, las decisiones se toman en base a expectativas. Nuevos incentivos económicos podrán modificar sus expectativas, pero ello tomará tiempo. Dado que los ciclos de producción agropecuaria son usualmente largos, la evidencia sobre la ventaja de los nuevos incentivos tendrá que repetirse por varios años para cambiar sus expectativas (5,6).

Esta aversión al riesgo explica por qué la adopción de tecnologías exógenas —en su generación— a la economía campesina, sea lenta, gradual, y esté sujeta a la experimentación inicial por un pequeño grupo de productores. La intensidad de la aplicación y de las adaptaciones, realizadas posteriormente por grupos mayores, estará en relación con los cambios de productividad observados en los primeros.

Este proceso de innovaciones afecta los costos unitarios de producción desde que los productores deben incurrir en gastos de inversión referidos a las fases de información, experimentación y adopción; inversiones que se encuentran restringidas por la falta de mercados financieros, de seguros, de insumos, de transacción, y de servicios de extensión en el medio rural (5,6). Por otra parte, se destacan los problemas aparejados por la lentitud en la incorporación y en los costos derivados de la misma, que se presentan para estos productores en el proceso de adopción tecnológica. Los costos de experimentación e información aumentan significativamente los costos unitarios de producción.

Sobre los paquetes tecnológicos, debe señalarse que en la mayoría de los casos no han sido diseñados para estas economías, constituyendo

uno de los mayores obstáculos para el desarrollo. De ahí, que muchas veces ignoren los argumentos en favor de una mayor rentabilidad, o la elevación de los rendimientos y las relaciones costo/beneficio.

Componentes de la producción familiar

Al analizar el sistema de producción familiar, se pueden distinguir los componentes efectivos (ingresos por venta de la producción, egresos por procesos productivos y gastos efectivos de la familia) a los que se deben agregar los no efectivos, provenientes básicamente de la producción para autoconsumo y los trabajos realizados fuera de la explotación.

Estos componentes no efectivos forman parte de la estrategia económica de este tipo de productores y su valoración resulta relevante no solo por la incidencia relativa en el ingreso global, sino porque permite y garantiza la continuidad de la explotación como tal.

Tipologías campesinas

En América Latina, la existencia, identificación, delimitación y caracterización de economías campesinas son relativas a cada región y espacio económico-social. Así, es posible encontrar una amplia gama de tipologías campesinas en atención a su pasado histórico, ideología y cultura, al grado de articulación con el mercado, a su especialización productiva, a su nivel de organización y desarrollo comunitario, y a su disponibilidad y calidad de los recursos naturales.

Los países que integran la Subregión Andina, por ejemplo, están vinculados entre sí por múltiples lazos históricos, sociales y geográficos, destacándose entre estos últimos la Cordillera de los Andes, cuya presencia, volumen y vigor se va atenuando de sur a norte.

Sin embargo, la Cordillera de los Andes, en donde se ha identificado el dominio cuantitativo de modalidades campesinas de producción, no

constituye un accidente geográfico de determinación económico-social, sino el espacio a partir de cuyo manejo y control se desarrolló históricamente una sólida civilización agraria y se generaron eficientes y productivas formas de organización social de la producción.

El sector más importante de esta Subregión está constituido por pequeños propietarios que representan más de las dos terceras partes de la población rural, superando los cuatro millones de familias. La población indígena ocupa lugar importante en la configuración poblacional, sobre todo en Bolivia, Perú y Ecuador, en donde alcanzan: 71, 47 y 43 %, respectivamente (14).

Por otra parte, cuando se analiza el interior de los espacios locales —la diversidad de experiencias, de estructuras organizacionales (asociaciones, comunas, cooperativas), y de acceso a determinados servicios (carreteras, financiamiento, asistencia técnica, dotación de insumos, acceso al crédito)— aparecen nuevas dificultades para agrupar de manera homogénea a las diferentes escalas de producción campesina. Lo expuesto se agudiza si se considera que una proporción importante de pequeños campesinos no disponen de tierra para la cría, alimentación y producción animal.

En la mayoría de los casos, inclusive en aquellos donde la eficiencia de los factores productivos se consideran aceptables, los pequeños productores tienen limitaciones para lograr los niveles de subsistencia familiar en términos de los procesos histórico-culturales particulares en cada área.

Una característica común al universo de pequeños productores es la escasa disponibilidad de tierra útil para el proceso productivo. Sin embargo, bajo esta consideración, la superficie de la propiedad campesina, expresada en términos globales, se torna relativa en los diferentes países y regiones. Así, por ejemplo, el prototipo de una explotación campesina localizada en los valles y partes altas de la Cordillera de los Andes de Ecuador es el minifundio, rezago de los antiguos huasipungos, cuya superficie se encuentra por debajo de las 5 hectáreas. Por el contrario, pequeña propiedad en las regiones tropicales de la costa o

amazonia es aquella cuya superficie se encuentra en alrededor de las 50 hectáreas, como resultado de los procesos de migración y colonización campesina.

El concepto de pequeña propiedad entonces, antes que deducible exclusivamente por el tamaño de la propiedad, se relaciona y depende de otros factores tan importantes como el anterior. Entre ellos se destacan la calidad del suelo, ubicación de la propiedad, disponibilidad de riego, infraestructura, acceso a los mercados, etc. Estas constataciones dificultan aún más una regionalización de los asentamientos campesinos de América Latina, a partir de la información censal disponible en los países (11).

Otra propuesta aceptable aunque posiblemente arbitraria, con la que coinciden algunos investigadores de la situación rural de América Latina, es la de que pequeños campesinos podrían considerarse a aquellos que, paralelamente a la producción de bienes agrícolas destinados a la canasta familiar, producen alimentos de origen animal a partir de un número inferior a 10 cabezas de ganado mayor (bovino, ovino, auquénido, porcino) y algunos animales menores (cobayos, aves) en propiedades menores a las 10 hectáreas de superficie.

CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL DE SALUD ANIMAL EN LA PRODUCCIÓN FAMILIAR

Con las restricciones que surgen de los comentarios precedentes, aquí se describen elementos de orden general, comunes a las áreas de Chalatenango, El Salvador y Ocotepeque, Honduras; Cordillera Central, Argentina y Chile; Itaguaí, Brasil; y al área andina, Ecuador. La pequeña producción pecuaria puede definirse por sus rasgos principales de la siguiente forma:

Los ingresos corrientes destinados al sustento diario del núcleo familiar provienen de la venta de productos generados por la actividad pecuaria (leche, huevos, lana, aves, cobayos, etc). Ingresos ocasionales se materializan por la venta de animales mayores o de productos agrícolas y por el salario

temporal, generalmente del jefe de la familia, en actividades urbanas. En los últimos años se observa un cambio en esta situación, verificándose una creciente participación de ingresos provenientes del trabajo femenino, a medida que surge la demanda de empleo de parte de la agroindustria intensiva en fuerza de trabajo.

La estructura de la producción se caracteriza por el predominio de la pequeña propiedad, tierras de mala calidad, tamaño pequeño del rebaño bovino que coexiste con otras especies animales, aprovechamiento integral y diversificado de la producción (carne, leche, abono, utilización de los animales como medio de trabajo para labores agrícolas, etc.), vinculación con la transformación artesanal de la producción (textiles, lácteos, cárnicos, etc.), escasa o ninguna tecnología (mecánica, química o biológica), y abundante mano de obra familiar. El componente genético de la ganadería es básicamente criollo o mestizo, rústico a las condiciones de manejo y características ambientales.

En contraste con la limitada o ninguna inversión de capital fijo, las prácticas tradicionales de manejo y características desfavorables de los recursos naturales en que opera el proceso productivo, la producción ganadera campesina registra algunos indicadores de cierta eficiencia productiva. Entre ellos se destacan la alta carga animal y rendimientos de leche y carne por unidad de superficie, aunque otros indicadores muestran un comportamiento diferente, como el intervalo entre partos, la edad al primer parto, y la producción de leche vaca/día, entre otros.

El perfil de producción y salud animal en estas economías presenta restricciones críticas derivadas de la carencia de forrajes para la alimentación del ganado. Estas se superan mediante el pastoreo libre de los animales, durante algunas horas del día en caminos vecinales, quebradas, acequias, etc., o mediante el suministro estacional de subproductos generados por las cosechas agrícolas (hojas y caña de maíz, tamo de trigo y cebada, caña de azúcar, etc.) que los tornan susceptibles a problemas nutricionales, carenciales y parasitarios que limitan su capacidad potencial productiva. Por las condiciones de manejo de los animales existe un alto riesgo de transmisión de

enfermedades zoonóticas al núcleo familiar (rabia, brucelosis, tuberculosis, hidatidosis, teniasis/cisticercosis, etc.), parcialmente incorporadas a programas de atención primaria de salud.

Otra de las restricciones fundamentales que afectan negativamente a los perfiles de producción animal de las economías campesinas se relaciona con la inexistencia de infraestructura de industrialización, acopio, transporte, comercialización y distribución de la producción animal. Ello provoca que el sistema de intermediación se apropie de una parte significativa de los eventuales excedentes monetarios.

En la mayoría de las unidades de producción campesina es posible observar una adecuada rotación de cultivos y prácticas de conservación y protección del suelo (área andina). Sin embargo, en ciertas áreas los asentamientos campesinos han dado lugar a la deforestación y deterioro del ambiente (América Central).

Existen ofertas tecnológicas que en la mayoría de los casos no responden a las necesidades de las economías familiares, lo que explica parcialmente la resistencia a su adopción.

El destino de los recursos materiales, humanos y financieros generalmente no se asigna en forma eficaz. En la mayoría de los casos existe dificultad de acceso a los canales formales para la notificación y registro de enfermedades vesiculares y de otras enfermedades transmisibles que eventualmente y de forma drástica puedan afectar a la población animal.

Economías familiares que tienen el mismo carácter estratégico, pero con una mayor articulación con el mercado, en áreas netamente ganaderas como las que se encuentran en la cuenca del Salado de Argentina, en Jaji en el estado de Mérida en Venezuela, en algunas regiones del sur del Brasil y en el Uruguay, muestran otra problemática. Por ejemplo, en la zona de Cacharí, que es mayoritariamente de producción familiar, se observa que:

- al ser la cría de animales la principal actividad comercial, los ingresos más importantes provienen de la venta de terneros. Los llamados ingresos extraprediales (no provenientes de la producción), devienen básicamente del cobro de

jubilaciones y de trabajos realizados fuera de la unidad familiar. Estos pueden ser transitorios o permanentes, y estar o no relacionados a la actividad agropecuaria;

- es frecuente el empleo de mano de obra en explotaciones de carácter empresarial, lo que refleja una articulación con otras tipologías de producción, resultando por lo tanto funcionales al sistema. Ambas subsisten porque pueden articularse (7).

Si bien el autoconsumo constituye una estrategia importante dentro de la economía familiar, un aspecto que merece destacarse es la tendencia declinante que éste presenta en los últimos años. Este hecho refleja la creciente articulación al mercado y por ende, una mayor monetización de la producción.

Desde el punto de vista de la calidad de los recursos naturales disponibles es importante señalar que, en el caso de la economía familiar pampeana, de Jají, del sur brasileño y de Uruguay, no se comprueban grandes desequilibrios con referencia a la producción empresarial. Esta situación poco frecuente en el resto de latinoamérica, se caracteriza por una progresiva marginación de esta producción hacia las peores tierras.

En términos generales se puede decir que estos sistemas de producción son relativamente sostenibles, ya que se mantienen en el tiempo sin afectar en gran medida los recursos naturales. Sin embargo, un nivel de inserción creciente al mercado pone en un serio riesgo la continuidad de estas economías. No obstante aquellas áreas de aptitud forestal, el continuo desplazamiento de estos sectores campesinos hacia zonas no incorporadas a la producción, conlleva al deterioro y agotamiento de los recursos naturales en el proceso de expansión de la frontera agrícola.

La producción promedio está por encima del valor promedio de la zona, y es similar al de otros tipos sociales más capitalizados. El rodeo en estas explotaciones está compuesto por animales de base genética, para fines específicos de producción.

El perfil de salud animal está afectado principalmente por enfermedades de la reproducción y parasitosis, estas últimas favorecidas por el anegamiento y el estancamiento de aguas. La ocurrencia de enfermedades vesiculares es esporádica.

Los bajos ingresos no permiten efectuar inversiones y obligan a realizar trabajos fuera de la explotación, fenómeno asociado con el despoblamiento y envejecimiento de la población rural. Existen dificultades en la producción y comercialización debido, en parte, a las deficiencias de obras de infraestructura vial y limitaciones de acceso al crédito, mismo que se encuentre afectado por una alta carga fiscal. La falta de cobertura social de salud para el pequeño productor es notoria.

Las dos áreas hasta aquí descritas expresan la variedad de los problemas que enfrentan los pequeños productores de América Latina y, por lo tanto, la diversidad de líneas de acción a utilizar para lograr una participación activa de estos actores sociales en propuestas tendientes a mejorar sus niveles de vida. Estas propuestas deben ser impulsadas desde los niveles centrales, siendo algunas de ellas de gran necesidad para las políticas nacionales globales, por ejemplo, los Sistemas de Información y Vigilancia Epidemiológica a Nivel de Salud Humana y de Salud Animal (2).

LOS PEQUEÑOS PRODUCTORES Y LOS PROBLEMAS DE SALUD Y PRODUCCIÓN

En cuanto a la atención de los problemas de salud animal también se puede afirmar que los pequeños productores toman selectivamente la tecnología recomendada con la particularidad que lo hacen asistemáticamente. Ello hace ineficiente dicha práctica, afectando a la productividad de sus rebaños.

El incremento de la productividad, y por ende de sus ingresos, está asociado en diversas proporciones a la atención de los problemas sanitarios característicos tales como, los derivados de la desnutrición, ectoparásitos y endoparásitos, brucelosis, baja natalidad y edad alta de las primerizas, tricomoniasis, leptospirosis, entre los más significativos. Sin embargo, se observa que los proyectos implementados hasta ahora no han

partido de la comprensión de sus necesidades específicas, por que no han contemplado el punto de vista de los pequeños productores, en especial aquellas propuestas tendientes a mejorar sus actuales condiciones de vida.

Una de las características del desarrollo tecnológico para el campo es que las innovaciones son exógenas a la economía campesina. Los campesinos pueden ser innovadores principalmente en el sentido de racionalizar, pero no en generar sus propias innovaciones. En esta línea de pensamiento se abre un espacio para tratar de eliminar la dependencia de las economías campesinas a las innovaciones que provienen desde afuera, estimulando el desarrollo de tecnologías propias. Esto implica en transformar al campesino pasivo en actor principal en la generación de innovaciones, y más aún, en modificar las relaciones actuales entre el campesinado, la extensión y la investigación agrícola (5).

En tal sentido, se entiende que toda comunidad tiene potencialidades para definir sus problemas y sus necesidades a través de un aprendizaje mutuo y reflexivo y, además, que cualquier acción que se decida emprender para alcanzar el éxito necesita de la participación de todos los sectores interesados desde un principio, es decir, desde la definición de los problemas para la elaboración de un diagnóstico hasta la determinación de las alternativas de solución.

La plena participación de la economía familiar en el análisis de su propia realidad promueve un proceso de transformación en beneficio de todos los involucrados. Por esta razón se entiende por participar, no solo estar informado y opinar sobre la marcha de las acciones, sino adquirir el derecho a intervenir en el proceso de toma de decisiones.

La capacidad de identificación de problemas y prioridades transita por el conocimiento de las condiciones particulares bajo las cuales se desenvuelven esas explotaciones pecuarias. Tal conocimiento debe sustentarse en la percepción de las necesidades reales que establecen los propios productores. Las acciones deberán apuntar a resolver esas prioridades, dando respuesta a los problemas sentidos por la comunidad, y permitiendo

avanzar en la definición del perfil de salud animal y salud pública.

LOS PEQUEÑOS PRODUCTORES Y LOS PROGRAMAS DE SALUD ANIMAL

Cualquier proyección que tenga por objetivo mejorar el perfil de salud animal y salud pública debe incorporar la participación de los pequeños productores. Necesariamente, deberán relacionarse a los servicios veterinarios públicos y privados, de manera de ofrecer cooperación en aquellas áreas sensibles para este sector de ganaderos, a través de estrategias diferenciales.

El proceso de participación es crucial desde el punto de vista de la viabilidad de los programas de salud animal y, en particular, para el Plan Hemisférico para la Erradicación de la Fiebre Aftosa (3). El Plan se encuentra en una fase donde la incorporación de los amplios sectores de pequeños productores que abarca poblaciones, territorios y ganado, que por su importancia serán clave de un Plan que cada vez más tendrá que sustentarse en la prevención y en la vigilancia epidemiológica.

LOS PEQUEÑOS PRODUCTORES Y LOS SISTEMAS LOCALES DE ATENCIÓN VETERINARIA

Las áreas donde la descentralización y participación comunitaria tuvieron un desarrollo mayor son las que lograron los avances más significativos respecto a los objetivos de salud animal. Por ejemplo, la implementación del Plan Nacional de Control de la Fiebre Aftosa 1990-92 en Argentina es una experiencia que une y moviliza en forma conjunta recursos del sector público y privado. Se han conformado alrededor de 350 Comisiones Locales de Lucha contra esta enfermedad que reúnen aproximadamente 266.000 productores que cubren la totalidad del país. La próxima etapa es extender esa participación entre los pequeños productores. Para tal fin, es necesario que los programas de salud animal, y en particular

los de combate a la fiebre aftosa, se inscriban en un proceso de desarrollo ganadero que tome, como punto de partida, la forma de percibir el problema y las soluciones sugeridas por los productores.

En el enfoque participativo subyacen una serie de premisas sobre el redimensionamiento del espacio local, es decir, la proyección que cobra una comunidad a partir de la identificación y aporte de soluciones a sus problemas; la labor del servicio local de salud, al ser en la mayoría de los casos el veterinario local el promotor y sustento de la propuesta; la rapidez, la flexibilidad y agilidad de la etapa de diagnóstico y la necesidad de contar con un grupo interdisciplinario de profesionales capaces de proporcionar técnicas acordes con las prioridades de los pequeños productores, como así también detectar problemas que constituyan líneas de investigación en sus respectivas disciplinas. Sin duda, una propuesta de esta naturaleza necesita, además, de profesionales consustanciados con la esencia de la misma.

La viabilidad de este tipo de propuestas participativas está condicionada por una parte, por la real participación de los productores y por otra, por la decisión y vocación de las instituciones públicas y privadas nacionales e internacionales en promover, conducir, y financiar los recursos materiales y humanos necesarios para llevar a cabo las actividades propias del enfoque enunciado.

Este tipo de propuestas en América Latina son de larga data. No obstante, el carácter de largo plazo que implica el desarrollo e implementación de este enfoque, hace que los intentos realizados no hayan obtenido mayor repercusión debido a obstáculos asociados con: a) necesidad de continuidad en el tiempo, b) inadecuada y en muchos casos inexistente propuesta técnica, c) decisiones políticas a corto plazo y d) alta movilidad de los técnicos que ejecutan estos proyectos.

En tal sentido, estas limitaciones deben ser consideradas desde la implementación, a fin de contrarrestar sus efectos adversos. Aunque un proceso participativo no garantiza la perfección en la captación de la realidad, permite definir con mayor precisión los problemas más sentidos de la comunidad, facilita la interacción y confronta la realidad con las interpretaciones teóricas y torna

más eficaz la intervención de las instituciones, profesionales, organizaciones y productores.

CONCLUSIONES

La problemática global de los pequeños productores involucra aspectos tan variados como los referidos a la tenencia de la tierra, producción pecuaria, nutrición, saneamiento ambiental, educación, comercialización, crédito, acceso a la asistencia técnica, problemas de innovación tecnológica, esquemas organizativos de las comunidades rurales. Estos aspectos conllevan a profundizar el conocimiento de esa realidad específica, identificando los problemas a resolver. Dentro de ellos, la definición de las prioridades establecidas por los productores resulta ineludible.

Los sistemas familiares de producción ganadera presentan problemas de salud pública y de salud animal de tal amplitud y complejidad que, su percepción respecto a ciertas enfermedades del ganado vistas en forma aislada, no despiertan su inquietud.

La capacidad de identificación de los problemas y de las prioridades pasa por un conocimiento de las condiciones particulares bajo las cuales se desenvuelven esas explotaciones pecuarias. Ese conocimiento debe sustentarse en la percepción sobre las necesidades reales que establecen los propios productores. Las acciones deben apuntar a resolver esas prioridades.

La atención a pequeños productores tendría como finalidades centrales la promoción de la salud pública y el fortalecimiento de la vigilancia epidemiológica. Asimismo, deberán tomar en consideración la gran cantidad de experiencias institucionales y extra institucionales que malograron, al no incorporar en el diseño a los verdaderos gestores de la transformación, que son los propios productores.

REFERENCIAS

1. ASTORI, D; ARRATE, C., GOYETCHE, L. *La agricultura familiar uruguaya: orígenes y situación actual*. Uruguay, Fundación de Cultura Universitaria, 1982.

2. ASTUDILLO, V.M., ROSENBERG, F.J., ZOTTELE, A., CASAS O., R. Considerações sobre a saúde animal na América Latina. *Revista Veterinária*, 9 (54): 37-43, 1990.
3. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA. *PANAFTOSA y las prioridades políticas de la OPS para el próximo cuatrienio*. Rio de Janeiro, 1994. (En prensa)
4. CEPAL. *Economía campesina y agricultura empresarial*. México, Ed. Siglo, XXI, 1982.
5. FAO. *Informe alimentario mundial*. Roma, 1984.
6. FAO. *Políticas agrícolas y políticas macroeconómicas en América Latina*. Roma, 1992.
7. FIGUEROA, A. Desarrollo agrícola. En: SUNKEL, O. (Comp.). *El desarrollo desde dentro: un enfoque neoestructuralista para América Latina*. México, El Trimestre Económico, 1991.
8. FIGUEROA, A. *Educación, mercados y tecnología en la pequeña agricultura de América Latina*. Santiago de Chile, FAO/CEPAL, 1993. 62 p.
9. IRIARTE, L.; BILELLO, G. *Propuesta de desarrollo rural participativo*. Argentina, Univ. Nac. de Mar del Plata, Univ. Nac. del Centro, 1992.
10. JORDAN, F. (Comp.). *La economía campesina. crisis, reactivación y desarrollo*. San José, Costa Rica, 1989. 292p. (Investigación y desarrollo/IICA 19).
11. ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. *Desarrollo y fortalecimiento de los sistemas locales de salud: salud de los pueblos indígenas*. Washington, D.C., OPS/OMS, 1993. 21p. (HSS/SILOS-34)
12. ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. La producción pecuaria de subsistencia. una necesidad para la salud y el bienestar de los pueblos. En: *VIII Reunión Interamericana de Salud Animal a Nivel Ministerial*, Washington, D.C., OPS/OMS, 27-29 de abril de 1993.
13. ORTEGA, E. La agricultura campesina en América Latina y el deterioro del medio ambiente. En: SUNKEL, O., GLIGO, N. *Estilos de desarrollo y medio ambiente en la América Latina*. México, Fondo de Cultura Económica, 1980. p. 538-579.
14. SERRÃO, U.M., DORA, J.F., MUZIO, F., TAMAYO, H., ZOTTELE, A., ASTUDILLO, V. Atención veterinaria local. /Local veterinary attention. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 57: 60-73, 1993.
15. TAMAYO, H. La estructura de producción como determinante de salud animal. En: LE CHAU (Ed.). *Investigación agraria y crisis*. Quito, Ecuador, Corp. Edi. Nac., 1986.

Anuncio

Catálogo de Publicaciones, 1952-1993
 Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS)
 Rio de Janeiro, Brasil, 1994

Este documento estará disponible en el segundo semestre de 1994. Se trata de una compilación de las publicaciones hechas por el personal técnico de PANAFTOSA.

FAMILY PRODUCTION AND ANIMAL-HEALTH STRATEGIES

A. ZOTTELE¹, H. TAMAYO², S. BRIEVA³, L. IRIARTE³

¹*Pan American Foot-and-Mouth Disease Center (PAHO/WHO)*

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

²*Pan American Sanitary Bureau (PAHO/WHO)*

Av. Naciones Unidas, 1204 e Iñaquito,

Ed. del Club de Leones 4° piso, Quito, Ecuador

³*Facultad de Ciencias Agrarias, Univ. Nac. de Mar del Plata*

CC. 276, Ruta 226, Mar del Plata, Argentina

SUMMARY. The foot-and-mouth disease eradication programs have reached an advanced phase in several countries of South America. Likewise, other regions of the continent are free of the disease and engaged in developing prevention activities indispensable to prevent the introduction of the virus. In both situations there exists a broad sector of livestock raisers generically characterized as "small producers". These producers have, in good measure, accompanied the continental effort to eliminate the scourge. However, foot-and-mouth disease prevention and eradication will rest on weak bases if a more active participation by these producers is not encouraged. To this end, it is necessary to incorporate the foot-and-mouth disease programs as one more component of the development activities envisaged for the sector. This perspective demands a greater understanding of the characteristics of the family-level livestock production system on the continent and the course of the institutional policies implemented for the sector.

After a long period in which the concept of the State as the principal regulator of the economic and social activities predominated, the fundamentals of that function have come under scrutiny and reconsideration. The fiscal deficits and the inefficient use of resources, among other factors, contributed to the rampant discrediting of certain public activities and to the periodical inflationary processes with their sequels of speculation and problems of economic calculations for investment and spending.

These facts weakened the capability to respond to the various sectorial problems. In particu-

lar, the deterioration of the public veterinary services, their excessive degree of centralization and bureaucratization underscored the already limited capacity to introduce effectively, in the livestock-producing industry, significant changes in the behavior of the animal-health and production profiles.

The consensus that sustained the advantages of the public sector in orienting and leading development gave way in the face of models proposing free markets and privatization of state businesses as better levers for development. As part of the neoliberal proposals, the economic policies stimulated the drastic reduction of the State's functions as generator of goods and services. One consequence of this situation was the cutback of funding which affected both the sanitary labors of those who carry out the veterinary services and the

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

motivation of the social segments related to the livestock industry.

Nevertheless, as some regions developed more acutely their capacity to analyze and understand the livestock-raising reality and the situation of animal health at the local level, the existing resources were identified and coordinated to produce veterinary attention services. This opened up the possibility of offering a better response to the problems of animal production.

The new situations urgently demand that alternatives for the small producers be included, considering their expectations and their potentials, which, moreover, is a requisite to increase their participation (8,9).

Five fields of action have emerged in this context, related to improving the animal-health profiles in the family-production areas:

- promote health in the development process by cooperating with livestock development in the family-production sectors;
- encourage the reform of the sector by means of processes for technical, administrative and financial decentralization of the Official Sanitary Services, so as to include the small producers in the so-called Local Veterinary Attention Systems;
- promote health from the concept that animal-health programs form a bridge between agriculture and public health;
- stimulate environmental protection and development associated with improvement of the animal-production profiles, in small producers' areas;
- support the control of diseases in the animal population which affect livestock production and public health.

In line with these ideas, this paper will discuss two topics. First, family production, or small production, and its strategic role in Latin American societies, will be characterized. Then suggestions will be submitted about a participatory approach to confront the changes in the animal-health profile in family-run agriculture and livestock-raising activities.

CHARACTERIZATION OF FAMILY PRODUCTION

Family agriculture

Family agriculture in Latin America possesses different characteristics by virtue of the varying historical and social circumstances of the stages that emerge from the configuration of the pre-Colombian cultures as well as from later processes of colonization.

The name "family producers" encompasses different realities, like that of the small (mini) landholders, peasant farmers, small producers, family producers, tenant farmers, sharecroppers, and others. Beyond the differences among these social sectors there are features in common for them all, such as the scarcity or lack of the resource land and capital and the family character of labor.

Some aspects of their heterogeneity find expression in significant differences in the pace of technological innovation and its adoption, in the level of productivity, and in the income. There are also differences in the levels of formal, informal and non-formal education, and in access to institutional credit (1).

The differences mentioned are seen among countries, among microregions within the same country, and within a single microregion. The image of a peasant agriculture, uniformly poor, technologically traditional, illiterate, isolated from the market and without access to the services of the State, does not always correspond to the reality of these countries (5).

The family operations materialize the ties of family and community integration in the productive process, by means of traditional practices based on the inclusion and use of the family labor force. These practices may eventually be complemented by hired labor.

Family operations are found throughout the continent, and in vast areas are dedicated to livestock production. They are characteristically an important source of supply for the domestic market and total a large number of families that depend on that activity (10). Thus, it is estimated that Ecuador

has some two million small peasant landowners who produce between 41 to 63% of ten basic foods of the family diet (15).

The number of poor persons in the agricultural scenario of Latin America has increased since 1970. According to FAO estimates, the term can be applied to two thirds of the rural population which encompasses approximately 126 million persons. CEPAL/UN studies estimate that the absolute number of poor jumped by 89 million persons from 1980 to 1989 (13).

The small producers tend to optimize their incomes and orient their production largely for their own consumption or for domestic consumption. Nevertheless, there are some minority sectors whose producers apply economic rationality, to maximize profits and can be said to be in a position to incorporate better technology.

Objectives of family production

The small livestock-production operation, organized on the family unit, facilitates a greater availability of food for the families and availability of resources insofar as it manages to increase productivity and revenue (4).

The peasant family unit is both a productive and a consumer unit. A significant part of its production is destined for self consumption and the other for exchange, so that it takes production and consumption decisions simultaneously (12).

On these farm units it is difficult to separate the domestic or "household" activities from the productive ones. In this sense, the first encompass a group of products intended for direct consumption or family consumption that meet a part of its needs, while the second, comprising the surplus after that "selfconsumption", is used for the acquisition of other goods that ensure the continuity of the productive unit.

The production unit is related to the product market through the surplus production component, and enters a commercial circuit governed by economic laws that respond to the logic of entrepreneurial economies. It also has relations

with the labor market insofar as the family workforce finds no application within the productive peasant unit and must seek employment outside it.

To understand the family unit's economic behavior, it is necessary to establish a postulate about the set of objectives it pursues and that guide its actions. Neoclassical economists have characterized the family economies as conservative and contrary to change. In reality, these economies' economic behavior is characterized by great aversion to risk, founded on the fact that they confront greater risks due to the instability of market prices and their own situation as "poor folk". That is why they diversify their production and exercise a response related to the economic stimuli. For example, when faced with lower prices for their products, they choose to increase the supply at the cost of a higher exploitation of family labor.

Due to the fact that the economic rationale of a unit emerges as response to the context in which it operates, describing it is essential to an understanding of the conditions of uncertainty that the unit faces in production and in exchange. The poor supply of resources, in both quantity and quality, leads the peasant family unit to a conduct characterized as an aversion to risk. It therefore seeks to minimize risks, choosing rather to sacrifice a small additional average revenue to the possibility of a large loss of revenue.

The risk-minimization rationale of the family unit implies that it seeks to ensure a minimal level of revenue. Given its poorness, it is in no condition to jeopardize its survival by engaging in high-risk activities.

Its production is diversified and not specialized. An empirical consequence of the postulate of aversion to risk is that the unit manages a diversified scheme of activities and, therefore, of resources.

These economies show a great weakness before the makeup of their production, which is spread out thin, atomized and diversified. They need to pass off the production quickly, even before the harvest periods, in order to continue the production cycle. To all of this may be added the almost non-existence of producers' organizations that defend their interests.

Another consequence is that the family unit's response to changes in economic incentives is not very clear, nor immediate. Under conditions of uncertainty, decisions are made on the basis of expectations. New economic incentives may change its expectations, but that will take time. Because the cycles of livestock and agricultural production are usually long, the evidence of the advantages of the incentives will have to be repeated for several years before the unit changes its expectations (5, 6).

This aversion to risk explains why the adoption of technologies generated outside the peasant economy is slow, gradual, and subject to the initial experimentation of a small group of producers. The intensity of the application and of the adaptations carried out later by larger groups will be closely related to the productivity and yield changes observed in the first small group.

This process of innovation affects the unit costs of production because the producers must incur investment expenditures during the phase of information, experimentation and adoption, investments that are found restricted by the lack of financing markets, insurance, inputs, transactions, extension services in the rural environment (5, 6). On the other hand, there are further problems related to the slowness in incorporating the innovations and to the costs thereof that confront the producers during the process of technological adoptions. The costs of experimentation and information significantly increase the unit costs of production.

Regarding technological packages, it should be underscored that in the majority of the cases they haven't been designed for these economies and actually constitute one of the major obstacles to development. So producers often ignore the arguments in favor of greater profitability, or increased revenues, or the cost/benefit relationships.

Components of family production

Upon analyzing the family productive system one can distinguish the effective components (revenue from selling production, outlay for production processes and the family's effective house-

hold expenses) to which the noneffective ones should be added, resulting basically from the production for selfconsumption and the work performed outside the family's property and activity.

These noneffective components form part of the economic strategy of this type of producer, and their valuation becomes relevant not only for their relative incidence in the overall revenue, but rather because it permits and guarantees the economic activity's continuity as such.

Peasant typologies

The existence, identification, delimitation and characterization of peasant economies in Latin America are relative to each region and economic-social space. Therefore, it is possible to find a wide range of peasant typologies as a function of their historic past, ideology and culture, of the degree of contact with the market, of their productive specialization, of their level of organization and community development, and of the availability and quality of their natural resources.

The countries that compose the Andean Subregion, for example, are linked together by multiple historic, social and geographic ties. Of notable significance in this web of interests is the Andes Cordillera, whose presence, size and vigor is diminished from south to north.

However, the Andes Cordillera, wherein the quantitative dominance of peasant forms of production has been identified, should not be taken as a geographical accident of social and economic formation, but rather as the space whose management and control developed a historically solid agrarian civilization and generated efficient and productive forms of social organization of production.

The most important sector of this Subregion is composed of small property owners who total up to more than two thirds of the rural population, in excess of 4 million families. The indigenous population occupies an important place in the populational makeup, above all in Bolivia, Peru and Ecuador, where it amounts to 71, 47 and 43%, respectively (14).

On the other hand, analysis of the inner composition of the local spaces—the diversity of experiences, organizational structures (associations, communal agencies, cooperatives), access to certain services (roads, financing, technical assistance, allocation of inputs, access to credit)—reveals new difficulties in homogeneously grouping the different scales of peasant production. This all becomes more acute if one considers that an important percentage of small farms do not have the lands necessary for animal breeding, feeding and production.

In most of cases, including those where the productive factors' efficiency is considered acceptable, the small producers face limitations to reaching family subsistence levels in terms of the historical and cultural processes particular to each area.

A characteristic common to the universe of small producers is the scant availability of land usable for the production process. However, under this consideration, the peasant property's size, expressed in overall terms, becomes relative in the different regions and countries. Thus, for example, the *minifundio* is the prototype of a peasant farm located in the valleys and highlands of the Andes Cordillera in Ecuador. Vestige of the ancient *huasipungos*, it is less than 5 hectares in size. Conversely, a small property in the Amazon or tropical region of the coast is that whose size is about 50 hectares, a result of the processes of peasant migration and colonization.

Therefore, the concept of "small property", rather than defined solely according to size of the property, is related to and depends on other factors just as important as the former. Such factors include soil quality, property location, availability of irrigation, infrastructure, access to markets, etc. These factors make it all the more difficult to regionalize the peasant settlements in Latin America, based on the census data available in the countries (11).

Another acceptable, albeit possibly arbitrary proposal with which some students of the rural situation in Latin America concur, holds that small peasants could be considered those who—concomitantly with the production of agricultural goods intended for the family "food basket"—also pro-

duce animal-origin foodstuffs from a herd of less than 10 head of large livestock (cattle, sheep, pigs, camelidos) and of some smaller animals (guinea pigs, poultry) on properties less than 10 hectares in size.

CHARACTERIZATION OF THE ANIMAL-HEALTH PROFILE IN FAMILY PRODUCTION

With the restrictions arising from the preceding comments, elements of a general order are described below; they are common to the areas of: Chalatenango, El Salvador, and Ocotepeque, Honduras; Central Cordillera, Argentina and Chile; Itaguaí, Brazil; and the Andean area, Ecuador. The small livestock production may be defined by its principal features, as follows:

The net revenues bound for the daily sustenance of the family members derive from the sale of products generated by the livestock-raising activity (milk, eggs, wool, poultry, guinea pigs, etc.). Occasional income is generated by the sale of larger animals or agricultural products and by temporary wages from urban activities, generally earned by the head of the family. A change in this profile has been observed in recent years, with a growing share of income earned by women. This fact accompanies the rising demand for employment of part of the intensive agribusiness in the work force.

The structure of production is characterized by the predominance of the small property, poor-quality land, small size of the bovine herd that coexists with other animal species, full and diversified use of the production (meat, milk, fertilizer, using animals as power for farm tasks, etc.), ties with the manual transformation of the production (textiles, dairy and meat products, etc.), little or no technology (mechanical, chemical, or biological), and abundant family labor. The genetic component of the livestock-raising aspect is basically a "criollo" or "mestizo" mixed breed, a rustic animal suitable for the breeding conditions and environmental characteristics.

In contrast with the limited or no investment of fixed capital, the traditional husbandry practices and unfavorable characteristics of the natural resources in which the productive process operates, peasant livestock production does possess some indicators of productive efficiency. For example, the high animal load and yields of milk and meat per surface unit. However, other indicators suggest a different behavior, such as the interval between births, age at first birth, and the production of milk per cow per day, among others.

The animal-health production profile in these economies shows critical restrictions deriving from the lack of forage for feeding livestock. Such restrictions are overcome by free-grazing the stock for a few hours daily along local roads, ditches, ravines, gullies, streams, etc., or by the seasonal availability of products of agricultural harvests (corn husks and stalks, wheat and barley husks, sugarcane, etc.) that render the stock susceptible to problems of nutrition, deficiencies, and parasites, all of which limit the potential productive capacity. The herd management and handling conditions also facilitate a high risk of transmission of zoonotic diseases to the family nucleus (rabies, brucellosis, tuberculosis, hydatidosis, teniasis, cysticercosis, etc.), partially incorporated into primary health-attention programs.

Another of the fundamental constraints that negatively affect the animal production profiles of the peasant economies is related to the lack of infrastructure for industrialization, storage, transport, marketing, commercialization and distribution of the animal production. This situation enables the intermediary system to appropriate a significant part of the eventual monetary surpluses.

The majority of the peasant production units, however, practice suitable crop rotation and soil conservation and protection (Andean area). But peasant settlements have given way to deforestation and environmental deterioration in certain areas (Central America).

The technological supply that does exist fails, in the majority of cases, to respond adequately to the needs of the family economies. And this partially explains the resistance to their adoption.

The end-use of the human, financial and material resources generally is not assigned in an efficient manner. In most cases it is difficult to attain access to the formal channels for notification and recording of vesicular diseases and other transmissible diseases that may eventually and drastically affect the animal population.

Different problems face those family economies having the same strategic character—but a greater interaction with the market—in largely livestock-raising areas like the Salado basin of Argentina, Jaji in Venezuela's State of Merida, some regions of southern Brazil, and in Uruguay. In the largely family-production zone of Cachari, for example, one observes that:

- because animal breeding is the main commercial activity, the most important revenue is derived from the sale of calves. The so-called "off-property" revenues (not resulting from the production) come basically from the payment of retirements and work performed "off" the family unit. These may be transitory or permanent, and may or may not be related to the agricultural and livestock-raising activity;

- working for farms of entrepreneurial character is frequent. This phenomenon reflects a relationship with other production typologies that therefore result in being functional to the system. Both subsist because they are able to interact (7).

Although self-consumption constitutes an important strategy in the family economy, an aspect that merits highlighting is the downward trend it has shown in recent years. This fact reflects the growing interaction with the market and, therefore, a greater monetization of production.

From the viewpoint of the quality of the available natural resources, it is important to stress that, in the case of the family economy of the Pampas, Jaji, southern Brazil and Uruguay, no great imbalances related to entrepreneurial production are observed. This situation—infrequent in the rest of Latin America—is characterized by a progressive marginalization of this production toward the worst lands.

In general terms it may be said that these production systems are relatively sustainable, since they are maintained over time without having a

great effect on natural resources. However, their growing level of insertion into the market subjects the continuity of these economies to a serious risk. Notwithstanding those areas having an aptitude for forestry, the ongoing displacement of these peasant sectors toward zones not incorporated into production encourages the deterioration and exhaustion of the natural resources in the process of the expansion of the agricultural frontier.

The average production is above the average value of the zone, and is similar to that of other more capitalized social types. The herd on these properties comprises genetic-base stock for specific production purposes.

The animal-health profile is mainly affected by reproduction diseases and parasitosis, the latter favored by flooding and stagnant waters. The occurrence of vesicular disease is sporadic.

The low revenues preclude investments and oblige the producers to find work off their property, a phenomenon associated with depopulation and the aging of the rural population. Difficulties exist in production and commercialization owing, in part, to the faulty transportation infrastructure and limitations in access to credit, even though affected by a high fiscal load. The lack of social health coverage for the small producer is notorious.

The two areas described up to this point express the variety of problems facing the small producers in Latin America and, therefore, the diversity of lines of action to utilize in achieving an active participation by these social actors in proposals intended to improve their levels of living. These proposals should be directed from the central levels, some of them being of great need for the overall national policies, for example the Epidemiological Surveillance and Information Systems at the Human-Health and Animal-Health Levels (2).

THE SMALL PRODUCERS AND THE HEALTH AND PRODUCTION PROBLEMS

With respect to attention to animal-health problems, it may also be affirmed that the small producers selectively take up recommended technol-

ogy, with the particularity that they do so in a non-systematic manner. This makes the practice inefficient and affects the productivity of their herds.

The increase of productivity and therefore of its revenues is related in various proportions to the attention to the characteristic sanitary problems such as, those deriving from malnutrition, ectoparasites, endoparasites, brucellosis, low natality and advanced age at first birth, trichomoniasis, and leptospirosis, among the most significant. Still, it is observed that the projects implemented to date have not originated in an understanding of their specific needs, because they have not contemplated the small producers' viewpoints, especially those proposals intended to improve their present living conditions.

One of the characteristics of the technological development for the field is that the innovations are exogenous to the peasant economy. The peasants may be innovators principally in the sense of rationalizing, but not generating, their own innovations. This line of thought opens a space for trying to eliminate the dependency of the peasant economies on the innovations coming from outside, stimulating the development of their own technologies. This implies transforming the passive peasant into the main actor in the generation of innovations. Moreover, this implies modifying the present relationships among the peasantry, the extension system and agricultural research (5).

In this sense, it is understood that every community has the potential to define its problems and its needs through a mutual and reflexive learning process. And, moreover, that any action undertaken to achieve success needs the participation of all the interested sectors from the outset, that is, from the definition of the problems for preparing a diagnosis to the determination of the alternatives for solution.

The full participation of the family economy in the analysis of its own reality promotes a process of transformation for the benefit of all those involved. Therefore, "to participate" is understood as not only being informed and expressing opinions about the march of the actions, but also acquiring the right to intervene in the decision-making process.

The capability to identify problems and priorities involves the awareness of the particular conditions under which those livestock production undertakings are developed. Such awareness must rest on the perception of the real needs as established by the producers themselves. The actions should be oriented to resolving those priorities, providing a response to the problems felt by the community and enabling the process to move forward in defining the animal-health and public-health profiles.

THE SMALL PRODUCERS AND THE ANIMAL-HEALTH PROGRAMS

Any project whose objective is to improve the animal-health and public-health profiles should include the small producers' participation. Necessarily, they should establish relationships with the public and private veterinary services, in order to provide cooperation in those sensitive areas for this sector of livestock producers, through differential strategies.

The process of participation is crucial from the standpoint of the viability of the animal-health programs and, in particular, for the Hemispheric Plan for the Eradication of Foot-and-Mouth Disease (3). The Plan is presently in the phase of inclusion of the broad sectors of small producers that encompass populations, territories and livestock which, due to its importance, will be the key for a Plan that will increasingly have to rely on epidemiological surveillance and prevention.

THE SMALL PRODUCERS AND THE LOCAL VETERINARY-ATTENTION SYSTEMS

The areas wherein decentralization and community participation have had a major development are those which attained the most significant advances with respect to the animal-health goals.

For example, the implementation of the National Foot-and-Mouth Disease-Control Plan 1990-1992 in Argentina is an experience that jointly unites and mobilizes public and private sector resources. Some 350 Local Commissions have been formed in the fight against this disease, uniting approximately 266,000 producers drawn from throughout the nation. The next stage is to extend that participation among the small producers. It is therefore necessary that the animal-health programs, particularly those engaged in the fight against foot-and-mouth disease, join in a livestock development process whose point of departure is the producers' way of perceiving the problem and the solutions they suggest.

The participatory approach rests on a series of premises related to redimensioning the local space, i.e., the projection expected by a community based on identifying and providing solutions for its problems; the work of the local health service, in most cases the local veterinarian being the promoter and prop of the proposal; the speed, flexibility and agility of the diagnosis stage, and the need for an interdisciplinary group of professionals capable of furnishing techniques in accordance with the small producers' priorities, and also of detecting problems that are lines of research in their respective disciplines. Undoubtedly, a proposal of this nature requires, moreover, professionals who are in accord and harmony with its essence.

The viability of this type of participatory proposal is conditioned on the one hand by the actual participation of the producers, and on the other, by the decision and vocation of the national and international private and public institutions in promoting, conducting and financing the human and material resources required to carry out the activities appropriate for the approach undertaken.

This type of proposal is not a recent phenomenon in Latin America. Nevertheless, the long-term character implied in the development and implementation of such an approach has inhibited the attempts made to date from achieving greater repercussions owing to obstacles associated with: (a) the need for continuity over time; (b) inadequate and, in many cases, inexistent technical

proposal; (c) short-term political decisions, and (d) high mobility of the technical personnel allocated to carrying out these projects.

In this sense, these limitations should be taken into account from the outset of implementation in order to thwart their adverse effects. Although a participatory process does not guarantee perfection in capturing the reality, it does enable a more precise definition of the problems most deeply felt by the community. It also facilitates interaction, confronts reality with the theoretical interpretations, and renders more efficacious intervention by the professionals, agencies and institutions.

CONCLUSIONS

The overall problems of the small producers involve a wide variety of aspects related to land ownership, livestock production, nutrition, environmental sanitation, education, commercialization, credit, access to technical assistance, problems of technological innovation, and factors inherent in the rural communities' organizational makeup. These aspects call for a profound knowledge of that specific reality so as to identify the problems to be resolved. Among them, the definition of the priorities set by the producers becomes ineludible.

The family systems of livestock production present public-health and animal-health problems of such breadth and complexity that the systems' perception of certain livestock diseases, viewed in an isolated fashion, does not arouse their concern.

The capacity to identify the problems and priorities requires a knowledge of the particular conditions under which those livestock production activities are developed. Such knowledge should rely on the perception of the actual needs established by the producers themselves. The actions undertaken should then seek to resolve those priorities.

The attention to small producers would envisage the promotion of public health and the strengthening of epidemiological surveillance as

its central purposes. Likewise, it should take into account the great number of institutional and extra-institutional experiences that have failed because their "design" did not incorporate the true makers of the transformation: the producers themselves.

REFERENCES

1. ASTORI, D; ARRATE, C., GOYETCHE, L. *La agricultura familiar uruguaya: orígenes y situación actual*. Uruguay, Fundación de Cultura Universitaria, 1982.
2. ASTUDILLO, V.M., ROSENBERG, F.J., ZOTTELE, A., CASAS O., R. Considerações sobre a saúde animal na América Latina. *Hora Veterinária*, 9 (54): 37-43, 1990.
3. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA. *PANAFTOSA y las prioridades políticas de la OPS para el próximo cuatrienio*. Rio de Janeiro, 1994. (In press)
4. CEPAL. *Economía campesina y agricultura empresarial*. México, Ed. Siglo, XXI, 1982.
5. FAO. *Informe alimentario mundial*. Roma, 1984.
6. FAO. *Políticas agrícolas y políticas macroeconómicas en América Latina*. Roma, 1992.
7. FIGUEROA, A. Desarrollo agrícola. En: SUNKEL, O. (Comp.). *El desarrollo desde dentro: un enfoque neoestructuralista para América Latina*. México, El Trimestre Económico, 1991.
8. FIGUEROA, A. *Educación, mercados y tecnología en la pequeña agricultura de América Latina*. Santiago de Chile, FAO/CEPAL, 1993. 62 p.
9. IRIARTE, L.; BILELLO, G. *Propuesta de desarrollo rural participativo*. Argentina, Univ. Nac. de Mar del Plata, Univ. Nac. del Centro, 1992.
10. JORDAN, F. (Comp.). *La economía campesina. crisis, reactivación y desarrollo*. San José, Costa Rica, 1989. 292p. (Investigación y desarrollo/IICA 19).
11. ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. *Desarrollo y fortalecimiento de los sistemas locales de salud: salud de los pueblos indígenas*. Washington, D.C., OPS/OMS, 1993. 21p. (HSS/SILOS-34)
12. ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. *La producción pecuaria de subsistencia. una necesidad para la salud y el bienestar de los*

- pueblos. En: *VIII Reunión Interamericana de Salud Animal a Nivel Ministerial*, Washington, D.C., OPS/OMS, 27-29 de abril de 1993.
13. ORTEGA, E. La agricultura campesina en América Latina y el deterioro del medio ambiente. En: SUNKEL, O., GLIGO, N. *Estilos de desarrollo y medio ambiente en la América Latina*. México, Fondo de Cultura Económica, 1980. p. 538-579.
 14. SERRÃO, U.M., DORA, J.F., MUZIO, F., TAMAYO, H., ZOTTELE, A., ASTUDILLO, V. Atención veterinaria local./Local veterinary attention. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 57: 60-73, 1993.
 15. TAMAYO, H. La estructura de producción como determinante de salud animal. En: LE CHAU (Ed.). *Investigación agraria y crisis*. Quito, Ecuador, Corp. Edí. Nac., 1986.

Announcement

Catalogue of publications, 1952-1993
Pan American Foot-and-Mouth Disease Center (PAHO/WHO)
Rio de Janeiro, Brasil, 1994

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

ANÁLISIS EPIDEMIOLÓGICO Y ATENCIÓN VETERINARIA EN SALUD ANIMAL

V. ASTUDILLO, A. ZOTTELE, F. DORA

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS)

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

RESUMEN. La epidemiología veterinaria se concibe como una disciplina cuyo objeto de estudio es la comprensión de los problemas de la salud productiva animal, incluyendo su base organizativa y los procesos de intervención. Esta disciplina es un instrumento indispensable en la planificación de la salud animal y en la intervención veterinaria. En este trabajo se definen los espacios y planos de explicación epidemiológica que permiten integrar la problemática de la salud animal, tanto desde la perspectiva esencial y general definidas por el sistema económico-social prevaeciente, como del carácter específico que se corresponde con los modelos particulares de las enfermedades transmisibles y de la producción. Los problemas de la salud productiva y la elaboración de sus estrategias de transformación demandan análisis prospectivos que permiten configurar el cuadro más probable de los escenarios donde el proceso de cambio se desarrollará.

El perfil de la salud animal presenta diferentes niveles de desarrollo derivados de las circunstancias históricas que, en distintos espacios y épocas, condicionan la producción ganadera (2). Los problemas relativos a la salud productiva de los animales agrícolas deben considerarse con relación a la organización económico-social que, en cada caso, ha alcanzado la producción animal como resultado de las actividades transformadoras de los hombres sobre el medio. Asimismo, se deben incorporar las relaciones socioeconómicas generadas en el proceso de producción dentro de esas sociedades (1).

Esas acciones productivas crean en el tiempo y en el espacio escenarios que se caracterizan por la existencia de una variedad de actores sociales y

de un dinámico proceso de intercambios e interrelaciones que se resumen en un cuadro de condiciones económicas, sociales, políticas y culturales.

Estas son las condiciones bajo las cuales se desarrollan las potencialidades productivo-reproductivas de los animales, los intercambios comerciales de insumos y productos de este proceso, al mismo tiempo que "determinan" las condiciones epidemiológicas para la generación y diseminación de cuadros mórbidos que afectan la producción y comercio de animales y sus productos.

En este enfoque, la epidemiología veterinaria considera toda la organización económico-social de la ganadería (estructura y procesos) como fuente de explicación para los problemas que afectan la salud productiva, que identifica y establece los mecanismos responsables por ocurrencias mórbidas, por su mantenimiento endémico en ciertas áreas y su difusión hacia otras, por su no ocurrencia

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

o aparición ocasional en algunas regiones, y finalmente, por permitir la caracterización de las condiciones de riesgo de las diferentes áreas y subpoblaciones ante un problema específico.

Existe una relación dialéctica entre salud productiva y enfermedad, pues son dos expresiones de una misma y sola realidad, la de una población animal que produce en medio de una organización económico-social. Entre ambos términos existe una relación de identidad causal, ya que una posible ecuación bioproductiva incluye la salud productiva como un todo inicial representado por una posibilidad fisiológico-económica y la enfermedad, que está comprendida en ese todo, como un riesgo o probabilidad económico-social.

Ambas situaciones tienen un mismo origen que está en la estructura de producción en que se dan. De ahí que solo la propia sociedad responsable por esa organización de la producción puede "dar o quitar" salud productiva a la población animal.

Este enfoque de la epidemiología veterinaria no solo visualiza la explicación de los problemas que afectan a la salud productiva, sino también trata sus soluciones considerando que en esa estructura de producción están inmersos los intereses de diversos actores sociales, los cuales son afectados de diversas maneras y grados por los diferentes problemas. Al mismo tiempo, los actores sociales poseen recursos de poder y materiales cuya utilización debe ser esencial para dar viabilidad y continuidad a las propuestas de solución. De esta manera, este enfoque amplio permite que la epidemiología veterinaria se convierta también en un instrumento de la planificación y gerencia de la atención veterinaria en el campo de la salud productiva.

Este enfoque de la epidemiología es de gran utilidad en cualquier dimensión espacial, sea nacional, regional o local. Sin embargo, su efectividad, expresada como capacidad de respuesta, es más objetiva en los niveles local y regional, ya que es allí donde los problemas ocurren, las estructuras económico-productivas tienen su existencia, los actores sociales se movilizan, y donde se pueden articular alianzas y consensos entre ellos y materializar la participación activa de la sociedad en la solución de los problemas que afectan la salud productiva.

ESPACIOS DE ANÁLISIS EPIDEMIOLÓGICO

Esta concepción incorpora los complejos procesos sociales que incluye la transformación del papel del Estado. Asimismo, las políticas de comercio internacional tienen una gran influencia incluyendo la organización de convenios subregionales de integración económico comercial. Estos han estimulado a los países de América Latina a revisar las orientaciones del sector agropecuario y agroindustrial. Con ello aumenta la responsabilidad de asimilar este proceso de cambio y de adecuar la capacidad productiva de nuestros rebaños, que incluye la protección y el fomento de esa capacidad productiva.

Los instrumentos disponibles para el análisis de los hechos y previsión de lo que se espera en los próximos años tienen ciertas limitaciones. Están basados en que los hechos del presente y del futuro pueden ser explicados en función del conocimiento de los hechos del pasado. Esto no es siempre posible.

Como se ha indicado, los fenómenos de la salud productiva animal son complejos y con característica transitoria. En el contexto de procesos permanentes y estructurales de la economía pecuaria, los factores coyunturales han pasado a tener una gran importancia sobre la explicación de situaciones. Cada momento condiciona un cambio en las relaciones que definen el momento siguiente. Esto hace que los modelos explicativos disponibles no sean enteramente capaces de reflejar esos comportamientos.

De ahí que sea necesario "*ver la epidemiología veterinaria*" como una *disciplina de síntesis* que abarca la comprensión de los problemas de la salud productiva animal como un todo, tanto en su estructura como en sus procesos. Es una disciplina que va más allá de los problemas de salud productiva específicos o de una enfermedad, considerando la sociedad en relación con la organización productiva de la ganadería, como fuente de explicación para los problemas y para sus soluciones.

La epidemiología veterinaria es un instrumento indispensable para la planificación de salud animal y para la conducción estratégica de los

procesos de atención veterinaria. Permite anticipar el conocimiento de las necesidades de atención, identificar y determinar las condiciones de riesgo, y orientar la definición de prioridades de atención y la utilización de los recursos disponibles.

La organización, funcionamiento y evolución de los mecanismos y acciones de atención veterinaria adquieren una nueva dimensión con el enfoque epidemiológico que incorpora el contexto de la realidad, que tiene importancia en la comprensión de los fenómenos de salud productiva animal. Ello posibilita una visión sistémica e integral de la salud y productividad animal, de su entorno económico-social, de los factores condicionantes y de las actividades desarrolladas.

Se abre un espacio a la necesidad de nuevos caminos que permitan colocar la problemática enfermedad-productividad animal como expresión de las condiciones ecoproductivas imperantes en diferentes espacios-población y entender las articulaciones entre estos y los procesos más generales de la organización económico-social.

Las concepciones tradicionales del campo veterinario a los problemas de salud productiva-enfermedad o trastorno animal, no son suficientes para explicar sus relaciones. De ahí que sea necesario abrir el campo hacia enfoques conceptuales y metodológicos más integrales, que tengan mayor capacidad de abarcar la complejidad real de los procesos determinantes, de describir y explicar las relaciones entre los procesos más generales de la sociedad (organización económico-social de la producción animal) con los perfiles de salud productiva-enfermedad de los sistemas ecoproductivos ganaderos y de los rebaños (2).

La descripción y explicación de los problemas de salud y productividad animal no es independiente de quién y desde qué posición lo hace. Cada grupo social, con intereses específicos en la actividad económico ganadera, tiene una "forma de ver y analizar" un problema específico en este campo y de "visualizar" su solución, sobre la eficacia socio-económica de las mismas con relación a sus intereses, aunque sean proyectos técnico-científicos. La forma como se perciben los fenómenos específicos en un sector económico tiene una potencia movilizadora de fuerzas (actores) sociales (3,4).

El predominio de una forma de pensamiento al respecto no es solo función de la mayor capacidad explicativa en abstracto de algunos técnicos. Frente a la explicación de la presentación de algunos problemas de salud animal y de sus soluciones, más de una vez en América Latina se ha observado una confrontación de conceptos, teorías, métodos y técnicas, creándose así un ámbito de conflictos y consensos entre los actores sociales.

La legitimidad de una forma de pensamiento frente a la sociedad, si bien está solucionada para quienes tienen el poder de hacer predominar sus proyectos, es también función de la potencialidad de dar respuesta a los problemas de salud animal desde el punto de vista de otros actores sociales y demostrar superioridad en los planos tecnológico y metodológico, frente a otras líneas de pensamiento.

Por otra parte, la legitimación de un cuerpo de pensamiento exige ocupar espacios y acumular fuerza pero, fundamentalmente, requiere un gran desarrollo metodológico y tecnológico. O sea, tener la capacidad de asumir todo el desarrollo científico-técnico anterior, redefinirlo y levantarlo a un nivel de mayor eficacia y eficiencia, incluyendo en ella las visiones alternativas del problema.

Como se señaló, la acumulación de fuerzas estará favorecida por la capacidad de plasmar un pensamiento más avanzado e integral sobre los problemas salud productiva-enfermedad animal, no solo por la mayor coherencia y fortaleza teórica de dicho pensamiento, sino por una capacidad técnica superior a la de las otras interpretaciones, y una mayor capacidad de dar respuesta a los problemas de salud productiva animal. Esto se aplica especialmente en los aspectos percibidos como apropiados por otros actores sociales, sobre todo de aquellos cuyo concurso de poder es necesario para viabilizar los proyectos que valoramos como importantes socialmente.

Los hechos que se identifican y se perciben como fenómenos salud productiva-enfermedad animal ocurren en diferentes dimensiones. Por una parte pueden ser variaciones singulares, o sea, entre animales o entre rebaños por atributos individuales. Esto puede ocurrir en relación con la presencia de fiebre aftosa en animales o rebaños,

unos vacunados y otros no vacunados contra la enfermedad (cuadro 1).

Otra dimensión posible está dada por las variaciones particulares, o sea, entre subpoblaciones o entre sistemas ecoproductivos diferentes en un país, en la ganadería de un gran estado o una microregión ganadera, y en un mismo momento dado (agrupaciones animales que difieren en las condiciones de organización económico-social de la producción animal). Esto puede ocurrir con respecto a la situación endémica de una enfermedad animal.

Puede ser que la brucelosis bovina sea endémica en regiones donde predomina el sistema ecoproductivo familiar de pequeños propietarios y no existe en las regiones de sistemas ecoproductivos de cría intensiva para carne, o de lecherías empresariales.

Por último, existe una dimensión posible final que corresponde a los flujos de hechos concernientes a la población animal total o global de un país, de un estado o de una microregión.

La forma como se define un problema de salud productiva animal delimita el espacio de explicación utilizado. Así, cuando se define un problema en el espacio singular, su potencia explicativa se limita a lo que se podría calificar como "*epidemiología del que*" (*enfermedad o trastorno*). La forma habitual de definición de los problemas a este nivel es la frecuencia y gravedad de una patología o trastorno específico, entre animales o entre rebaños.

La explicación de estos hechos está vinculada a las formas específicas de manejo de esos animales y de esos rebaños, o la exposición individual a factores o procesos de riesgo, constituyendo así los

Cuadro 1. Espacios y planos de explicación epidemiológica

ESPACIOS	PLANOS		
	ESENCIA	ACTORES SOCIALES	FENOMENOS
GENERAL	SISTEMA ECONÓMICO Y SOCIAL.	ORGANIZACIONES ECONÓMICAS Y SOCIALES. POLÍTICAS Y ESTRATÉGICAS. CONSUMO	PRODUCCIÓN DE BIENES Y SERVICIOS. DISTRIBUCIÓN DEL INGRESO.
PARTICULAR	SISTEMA DE PRODUCCIÓN PECUARIA.	ORGANIZACIONES ECONÓMICAS Y SOCIALES DEL SECTOR POLÍTICAS PECUARIAS.	PERFIL DE SALUD ANIMAL P: f(N,M,F,) MAN, GENT, NUT.
SINGULAR	MODELO EPIDEMIOLÓGICO (ECOSISTEMAS)	ORGANISMOS PÚBLICOS Y PRIVADOS. PROGRAMAS DE FIEBRE AFTOSA	OCURRENCIA DE FOCOS. DAÑOS, COBERTURA.

llamados grupos de riesgo (2,3). Los principios genéricos definidos por la epidemiología a este nivel son las leyes de variación de agentes, de huéspedes y de los riesgos.

En este espacio se ubican la mayor parte de los desarrollos metodológicos y técnicos de la epidemiología veterinaria para estudiar epidemias, evaluar factores de riesgo, hacer vigilancia epidemiológica de algunos problemas específicos, y evaluar tecnologías.

La potencia de acciones sanitarias transformadoras sobre los problemas está limitada a las posibilidades tecnológicas que se hayan desarrollado dentro de esos límites. El tipo de acciones que se derivan de esta forma de definición y explicación de los problemas de salud/productividad-enfermedad animal se orientan al control de los daños físico-sanitarios y riesgos específicos y, consecuentemente, de la organización de un modelo de atención veterinaria con programas dirigidos a patologías específicas, muchas veces verticalistas y centralizadoras. Sin embargo, es necesario que los técnicos dominen el bagaje técnico disponible a este nivel para dar respuesta a problemas de la salud productiva animal desde los servicios y en condiciones de limitación de recursos de poder.

Esto es básico para ganar legitimidad, y para poner en evidencia las limitaciones del enfoque y la necesidad de redefinir los problemas en espacios superiores.

La definición y explicación de los problemas de salud productiva en el *espacio particular* correspondería a lo que podría llamarse "*epidemiología de quién*" (*sistemas ecoproductivos*), en que los problemas se definen como variaciones en el perfil salud productiva-enfermedad en los sistemas ecoproductivos ganaderos.

En este caso, la explicación de los problemas de salud animal se focaliza en el proceso de organización (estructura y dinámica) de las condiciones de producción animal a través de la inversión técnico-material que las crea (capacidad productiva/salud animal) de cada sistema ecoproductivo animal a través de diferentes "momentos" de dicho proceso.

El abordar los problemas de salud productiva animal a este nivel permite tener una mayor potencia

explicativa en términos de productividad-enfermedad animal. Esto se debe a que se incorpora todo el arsenal de aspectos relativos a la estructura y dinámica de las condiciones de producción de la población animal, que son las que determinan el perfil salud productiva-enfermedad animal en cada sistema ecoproductivo animal.

El proceso de organización de las condiciones de producción animal en cada ecosistema productivo comprende al menos cuatro momentos básicos:

- a) el momento biológico poblacional, relacionado a la fecundidad, gestación, precocidad;
- b) el momento ecológico, relacionado a pasturas, densidad animal, exposición y ciclos epidemiológicos de enfermedades, saneamiento ambiental, condiciones de producción;
- c) el momento de manejo animal, relacionado a movimientos zootécnicos, rotación de campos, medidas de protección sanitaria, alimentación, y
- d) el momento económico productivo, relacionado a las relaciones económicas de la producción animal, la inserción en el proceso productivo, las relaciones con el mercado de insumos y el de productos, la comercialización animal, la productividad animal.

La concepción del momento involucra un proceso conjunto que supera la noción de etapa y la visión de estructuras de procesos independientes. Cada momento incluye el conjunto de los otros momentos y es afectado por ellos. Al abordar un momento dado, encontramos todos los momentos.

Al abordar la explicación de los problemas de salud animal, a nivel del espacio particular, se pretende fortalecer esa capacidad explicativa, disminuir las dificultades que existen en muchos servicios de salud animal para definir los problemas y evaluar las acciones en términos de salud productiva animal, incorporar un pensamiento socioeconómico más avanzado en los espacios técnicos de salud animal, asumiendo la potencialidad explicativa de las ciencias biológicas, económicas y sociales a partir de la definición de problemas de salud productiva-enfermedad animal y de la selección de acciones que potencien una mayor efectividad y eficiencia.

Los tipos de acciones sanitarias derivadas del estudio del espacio particular tenderían a organizarse en planes de salud animal por sistemas ecoproductivos, incluyendo los flujos de comercio. Esto abriría más posibilidades a la descentralización de la atención veterinaria y a la participación de los ganaderos y otros segmentos sociales que conviven con dichos sistemas, buscando mejorar la salud y productividad animal.

En resumen, tratar los problemas a nivel de *espacio de lo particular* amplía la potencia explicativa y de transformación.

Finalmente, los problemas de salud productiva pueden ser vistos como variaciones a nivel del espacio de lo general, donde son identificados en una población ganadera de un país, estado o una gran región. Su análisis permite seleccionar los problemas de salud productiva-enfermedad con modelos económicos, cambios históricos de los procesos políticos, e impacto de grandes catástrofes.

De ahí que este nivel sea el de la revisión de las políticas y planes de salud animal. Los problemas aparecen como necesidades de decidir entre prioridades de diferentes grupos de población animal o sistemas ecoproductivos ganaderos, o entre diferentes planes, la forma de inserción de los perfiles de salud-productividad animal y de modelo de atención veterinaria con los procesos económicos, sociales, políticos y ecológico-regional. Aquí se definen las características básicas del modelo de atención veterinaria.

Es importante llamar la atención sobre el carácter no excluyente de los tres espacios indicados (singular, particular y general). Por el contrario, se deben considerar como complementarios. El espacio de lo general incluye lo particular y este lo singular. En las acciones de salud animal está implícito dar respuesta en el espacio de lo singular, aun cuando tenga condiciones de identificar y explicar sus problemas a nivel general.

Como última consideración, el tratamiento de los problemas de salud productiva, su identificación y explicación para la elaboración de estrategias de transformación no debe limitarse a

la situación observada ni a la extrapolación de series de datos históricos.

Es necesario realizar *análisis prospectivos* (inferir prospectivamente) para configurar el cuadro más probable de los escenarios donde el proceso de cambio se desarrollará. De esta manera podrán evaluarse las posibles modificaciones que pueden ocurrir en los distintos aspectos considerados (nivel productivo, problemas de salud animal, factores de riesgo, estrategias de transformación). Este enfoque implica el desarrollo de una epidemiología veterinaria prospectiva, que permita desarrollar escenarios epidemiológicos futuros con una concepción multidimensional e histórica consecuente con los escenarios productivos, económicos, sociales y políticos.

RECONOCIMIENTO

Este trabajo forma parte del Informe Final del Seminario Regional Conjunto FAO/OPS/OMS sobre análisis costo-beneficio y toma de decisiones para directores de programas de salud animal, celebrado en Buenos Aires, Argentina, del 29 de septiembre al 2 de octubre de 1992. Su publicación en este número del *Boletín* cuenta con la anuencia de la FAO.

REFERENCIAS

1. ASTUDILLO, V. M., ZOTTELE, A. C., DORA, F. Desarrollo ganadero y salud animal en Latinoamérica. *Livestock development and animal health in Latin America. Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 57: 7-22, 1991.
2. ASTUDILLO, V. M., ROSENBERG, F. J., ZOTTELE, A., CASAS O., R. Considerações sobre a saúde animal na América Latina. *Hora Veterinaria*, 9 (54): 37-43, 1990.
3. MATUS, C. *Planificación de situaciones*. Fondo de Cultura Económica, 1980.
4. MATUS, C. *Política y plan*. 2. ed. Caracas, Venezuela, Ed. IVEPLAN, 1980.

EPIDEMIOLOGICAL ANALYSIS AND ANIMAL-HEALTH VETERINARY ATTENTION

V. ASTUDILLO, A. ZOTTELE, F. DORA

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

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

SUMMARY. Veterinary epidemiology is conceived as a discipline whose purpose of study is an understanding of the problems of productive animal health, including its organizational basis and the processes of intervention. This discipline is an indispensable instrument in animal-health planning and in veterinary intervention. This paper defines the spaces and planes of epidemiological explanation that enable observers to assess the problems of animal health from the essential and general perspectives defined by the prevailing economic and social system, as well as from the specific character corresponding to the particular models of the transmissible diseases and of production. The problems of productive health and the conception of its strategies of transformation, require prospective analyses that lead to a configuration of the most probable of the scenarios wherein the process of change will be developed.

The profile of animal health presents different levels of development derived from the historical circumstances which, in distinct spaces and at distinct times, have conditioned livestock production (2). The problems related to the productive health of farm animals must be pondered in relation to the economic and social organization which, in each case, has achieved livestock production as the result of activities by which man has transformed the environment. Likewise, the socio-economic relationships generated in the production process within those societies should also be incorporated (1).

Those productive actions create, over time and space, scenarios characterized by the existence

of a variety of social actors and a dynamic process of exchanges and interrelationships that form a picture of economic, social, political and cultural conditions.

They are the conditions under which develop the productive-reproductive potentialities of animals, the commercial exchanges of this process' inputs and products. At the same time, they "determine" the epidemiological conditions for the generation and spreading of morbid situations that affect the production and trade of animals and their products.

From this approach, veterinary epidemiology considers the livestock industry's entire economic and social organization (structure and processes) as a source of explanation for the problems affecting productive health, that identifies and establishes the mechanisms responsible for morbid occurrences, for their endemic presence in certain

Reprint requests to:

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

areas and their spreading toward others, for their nonoccurrence or occasional appearance in some regions and, finally, for making it possible to characterize the risk conditions of the different areas and subpopulations vis-à-vis a specific problem.

A dialectic relationship exists between productive health and disease, whereas they are two expressions of the same and sole reality: that of an animal population producing in the midst of an economic-social organization. Between both ends there exists a relationship of causal identity, since a possible bioproductive equation includes productive health as an initial whole represented by a physiological-economic possibility, and the disease, which is encompassed in that whole as a risk or economic and social probability.

Both situations share the same origin in the structure of production in which they occur. Therefore only the very society responsible for that production organization can "give or take" productive health to or from the animal population.

This veterinary epidemiological approach not only visualizes the explanation of the problems that affect productive health, but also weighs solutions considering that this production structure embraces the interests of diverse social actors that are affected in varying ways and degrees by the different problems. At the same time, the social actors possess power resources and materials whose utilization should be essential to yield feasibility and continuity for the solutions proposed. In this way, the broad approach of veterinary epidemiology enables it to metamorphose into an instrument of planning and management for veterinary attention in the productive health field.

This approach of epidemiology is of great use in any spatial dimension, whether national, regional or local. Nevertheless, its effectiveness, expressed as a response capability, is more objective at the local and regional levels. It is there that the problems occur, that the economic-productive structures exist, that the social actors are mobilized and alliances and consensuses forged among them. And it is there that the society's active participation in solving the problems affecting productive health can be materialized.

SPACES OF EPIDEMIOLOGICAL ANALYSES

This concept incorporates the complex social processes that include the transformation of the State's role. Likewise, international trade exercises great influence, including the organization of subregional economic and trade-integration agreements. These have stimulated the Latin American countries to review the orientations of the agricultural and agroindustrial sector. The result increases the responsibility of assimilating this process of change and of raising the productive capability of our herds, including the protection and expansion of that productive capability.

The instruments available for analyzing the facts and forecasting expectations in the coming years disclose certain limitations. Such instruments are based on the idea that present and future facts and factors can be explained through the knowledge of the facts of the past. This is not always possible.

As has been mentioned, the phenomena of productive animal health are complex and characteristically transitory. Within the context of the livestock economy's permanent and structural processes, the conjunct factors have assumed a great importance in explaining situations. Each moment conditions a change in the relationships that define the following moment. The ensuing result is that the available explicative models are not entirely able to reflect such behavior.

It thus becomes necessary to "*view veterinary epidemiology*" as a *discipline of synthesis* that embraces the understanding of productive animal-health problems as a whole, in both their structure and their processes. As a discipline, it goes beyond the specific productive-health problems or beyond a disease, preferring to consider the society in relation to the livestock industry's productive organization as the source for explaining and solving the problems.

As an indispensable instrument for animal-health planning, and for strategically steering the veterinary attention processes, veterinary epidemiology enables one to anticipate the needs of attention, identify and determine the risk factors,

orient both the definitions of the priorities of attention and the utilization of available resources.

The organization, functioning and evolution of the veterinary attention mechanisms and actions take on a new dimension with the epidemiological approach that incorporates the context of reality, of major importance in understanding the productive animal-health phenomena. This makes it possible to develop a systemic and integral view of animal health and animal productivity, of their economic and social milieu, of the conditioning factors and of the activities developed.

A space thus opens to the need for new routes that enable the problematics of animal productivity and disease to be taken as an expression of the ecoproductive conditions dominant in different population-spaces and to understand the associations and connections between them and the more general processes of the economic and social organization.

The traditional conceptions held in the veterinary field about the problems of animal disturbance or productive health-disease are unable to explain their relationships. Thus it becomes necessary to open the field toward more integral methodological and conceptual approaches that have a greater capability to encompass the real complexity of the determinant processes to describe and explain the relationships between the society's more general processes (economic and social organization of animal production) and the productive health-disease profiles of the livestock-raising ecoproductive system and of the herds (2).

With respect to their description and explanation, the animal-health and productivity problems are not independent of the describer or explainer, nor of the standpoint adopted. Each social group with specific interests in the livestock economy and activity has its own way of "regarding and analyzing" a specific problem in this field and of "visualizing" its solution, considering their socioeconomic efficacy vis-à-vis their interests even though they may be technological or scientific projects. The way in which the specific phenomena are perceived in the economic sector conveys a mobilizing potential of the social (actors) forces (3,4).

The predominance of a way of thinking about this matter is not only a function of the greater abstract explanatory capability of some technical personnel. Given the explanation of the appearance of certain animal-health problems and of their solutions more than once in Latin America, there has been a confrontation of concepts, theories, methods and techniques, which has created an environment of conflicts and consensuses among the social actors.

The legitimacy of a way of thinking vis-à-vis a society, although it may be resolved for those who have the power to force their projects to dominate, is also a function of the potentiality to respond to animal-health problems from the viewpoint of other social actors and to demonstrate superiority on the technological and methodological planes, where other ways of thinking are concerned.

On the other hand, the legitimization of a body of thought requires that space be opened and forces accumulated, but fundamentally it requires a large-scale technological and methodological development. Which is to say, having the capability to assume all the preceding scientific and technical development, redefine it and lift it to a higher level of efficacy and efficiency, and including in that legitimacy the alternative views of the problem.

As underscored above, the accumulation of forces will be favored by the capability to forge a more advanced and integral thinking about the productive health-animal disease problems, not only because of the greater theoretical strength and coherence of such thinking, but rather because of a technical capability superior to that of the other interpretations, and a greater capability to respond to the animal productive-health problems. This applies especially in the aspects perceived as relevant by other social actors, above all those whose resources of power are necessary to render feasible the projects that we value as socially important.

The facts and occurrences that are identified and perceived as animal productive health-disease phenomena occur in different dimensions. On the one hand they may be singular variations, that is, among animals or among herds by individual attributes. This may occur in relation to the pres-

ence of foot-and-mouth disease in animals or herds, some vaccinated and other not vaccinated against the disease (table 1).

Another possible dimension is given by the particular variations, that is, among subpopulations or among different ecoproductive systems in a country, in the livestock industry of a large state or a livestock-raising microregion, at the same given moment (animal groupings that differ in the economic-social organization conditions of animal production). This may occur with respect to the endemic situation of an animal disease.

Perhaps bovine brucellosis is endemic in regions where the small proprietary family ecoproductive system predominates, or the disease may not exist in regions of intensive beef-raising ecoproductive systems or of entrepreneurial dairy farming.

Finally, there exists a possible final dimension that corresponds to the flows of facts concerning the overall or total animal population country, state or microregion.

The form in which an animal production health problem is defined delimits the explanatory space utilized. Thus when a problem is defined in a singular space its explicative potential is limited to what could be termed "*epidemiology of what*" (*disease or disturbance*). The usual form for defining the problems at this level is the frequency and gravity of a pathology or specific disturbance among animals or among herds.

The explanation of these facts is linked to specific forms of managing these animals in these herds, or the individual exposure to factors or processes, thus making up the so-called risk groups (2,3). The generic principles define

Table 1. Spaces and Planes of Epidemiological Explanation

SPACES	PLANES		
	ESSENCE	SOCIAL ACTORS	PHENOMENA
GENERAL	ECONOMIC & SOCIAL SYSTEM.	SOCIAL & ECONOMIC ORGANIZATIONS. POLICIES & STRATEGIES. CONSUMPTION	PRODUCTION OF GOODS & SERVICES. INCOME DISTRIBUTION.
PARTICULAR	LIVESTOCK PRODUCTION SYSTEM.	ECONOMIC AND SOCIAL ORGANIZATIONS OF THE LIVESTOCK SECTOR. POLICIES	ANIMAL-HEALTH PROFILE P: F(N,M,F) MAN, GENT NUT.
SINGULAR	EPIDEMIOLOGICAL MODEL. (ECOSYSTEM)	PUBLIC & PRIVATE BODIES. FMD PROGRAMS	OCCURRENCE OF FOCI. DAMAGE, COVERAGE.

epidemiology at this level are the laws of variation of agents, hosts and risks.

This space contains the major part of veterinary epidemiology's technical and methodological developments to study epidemics, to evaluate risk factors, to conduct epidemiological surveillance of some specific problems, and to evaluate technologies.

The potential of transformative sanitary actions on the problems is limited to the technological possibilities that have been developed within those limits. The types of actions that are derived from this form of definition and explanation of the animal health/productivity-disease problems are oriented toward the control of the physical and sanitary damages and specific risks. Consequently they employ the organization of a veterinary attention model with programs directed to specific pathologies, very often verticalist and centralising. Nevertheless, it is necessary that the technicians dominate the technical knowledge available at this level in order to reply to problems of animal productive health from the services and in conditions of limited power resources.

This is basic to earn legitimacy, to evidence the limitations of the approach and the need to redefine the problems in larger spaces.

The definition and explanation of the productive-health problems in *the particular space* would correspond to what could be called the "*epidemiology of whom*" (*ecoproductive systems*) wherein the problems are defined as variations in the productive health-disease profile at the level of livestock-raising ecoproductive systems.

In this case the explanation of animal-health problems focuses on the process of organization (structure and dynamics) of the animal-production conditions through the technical-material investment that creates them (productive capacity/animal health), of each animal ecoproductive system through different "moments" of the said process.

Approaching the problems of animal productive health at this level leads to a greater explicative potential in terms of animal productivity and disease. This results from the inclusion of

all the arsenal of aspects relative to the structure and dynamics of the production conditions of the animal population. Those are the conditions that determine the animal productive health-disease profile in each animal ecoproductive system.

The process of organization of the animal-production conditions in each productive ecosystem encompasses at least four basic moments:

(a) the populational-biological moment, associated with fecundity, gestation and precocity;

(b) the ecological moment, associated with pasturelands, animal density, exposure and disease epidemiological cycles, environmental sanitation and production conditions;

(c) the animal-management moment, associated with zootechnical movements, field rotation, sanitary protection measures, feeding, and

(d) the economic-productive moment, associated with the economic relationships of animal production, its insertion into the productive process, the relations with the inputs and products markets, animal trade and animal productivity.

The conception of moment involves a joint process that exceeds the notion of stage or phase and the view of structures of independent processes. Each moment conjoins the other moments and is affected by them. Upon scrutinizing a given moment we encounter all the moments.

Upon examining the explanation of the animal-health problems, at the particular space level, the intention is: to strengthen that explicative capability; to reduce the difficulties existing in many animal-health services with respect to defining the problems and assessing the actions in terms of productive animal health; to annex a more advanced socioeconomic thinking in the animal-health technical spaces, assuming the explicative potentiality of the biological, economic and social sciences based on the definition of animal productive health-disease problems and on the selection of actions that encourage greater effectiveness and efficiency.

The types of sanitary actions derived from the study of the particular space would tend to be organized on animal-health planes according to ecoproductive systems, including the flows of trade. This would open further possibilities for the decen-

tralization of veterinary attention and for the participation of the livestock-raisers and other social segments that cohabit with such systems, all seeking to improve animal health and animal productivity.

In summary, dealing with the problems at the level of *particular space* broadens the explicative and transformative potentials.

Finally, the productive health problems may be viewed as variations on the general space level, where they are identified at the level of a livestock population of a country, state or large region. This level of analysis enables the productive health-disease problems to be selected with economic models, historical changes of the political processes, and impact of large catastrophes.

So it follows that this is the level of the review of animal-health policies and plans. The problems appear as needs to decide, from among priorities of different animal population groups, livestock ecoproductive systems, or different plans, the proper way to insert the animal-health productivity profiles and the veterinary attention model with the economic, social, political and ecological-regional processes. The basic characteristics of the veterinary attention model are defined at this level.

It is important to draw attention to the nonexclusive character of the three spaces discussed (singular, particular, general). On the contrary, they should be considered as complementary. The general space includes the particular, which in turn includes the singular. It is implicit in the animal-health actions to respond in the singular space, even when the activity has conditions to identify and explain its problems at the general level.

As a final consideration, the treatment of the productive health problems, their identification and explanation for the drawing up of transformative strategies, should not be restricted to the situation observed nor to the extrapolation of series of historical data.

Prospective analyses must be carried out (infer prospectively) to provide the most probable of the scenarios wherein the process of change will be developed. In this way, one may evaluate the possible modifications that can occur in the different aspects under consideration (productive level, animal-health problems, risk factors, transformative strategies). This approach implies the development of a prospective veterinary epidemiology that enables students of the subject to develop future epidemiological scenarios having a multidimensional and historical conception ensuing from the economic, social and political productive scenarios.

ACKNOWLEDGEMENTS

This paper is part of the Final Report by the FAO/PAHO/WHO Joint Regional Seminar on cost-benefit analysis and decision-making for directors of animal-health programs. The Seminar was held in Buenos Aires, Argentina, from September 29 to October 2, 1992. Publication in this issue of the *Bulletin* was kindly agreed to by the Food and Agriculture Organization of the United Nations.

REFERENCES

1. ASTUDILLO, V. M., ZOTTELE, A. C., DORA, F. Desarrollo ganadero y salud animal en Latinoamérica. *Livestock development and animal health in Latin America. Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 57: 7-22, 1991.
2. ASTUDILLO, V. M., ROSENBERG, F. J., ZOTTELE, A., CASAS O., R. Considerações sobre a saúde animal na América Latina. *Hora Veterinaria*, 9 (54): 37-43, 1990.
3. MATUS, C. *Planificación de situaciones*. Fondo de Cultura Económica, 1980.
4. MATUS, C. *Política y plan*. 2. ed. Caracas, Venezuela, Ed. IVEPLAN, 1980.

PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA LA FIEBRE AFTOSA

J.L. da SILVA, M.M. KANASHIRO, D.L. BRUM

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

RESUMEN: Se describen los anticuerpos monoclonales (AcMs) producidos contra los virus de la fiebre aftosa tipos O, A y C. Para la caracterización preliminar se utilizaron las pruebas de virus-neutralización y seroprotección, y para la reacción de los AcMs, la prueba EITB con la proteína desnaturizada del virus. Algunos AcMs que no neutralizaron la infección del virus en cultivos de tejidos se mostraron capaces de neutralizarla en ratones lactantes. Los AcMs designados 7EE6 y 7JA1, originarios del virus C₃ Indaial, mostraron reacción cruzada con los virus heterólogos O₁ Campos y A₂₄ Cruzeiro de la fiebre aftosa.

La protección de animales contra la infección por aftovirus es una tarea compleja que puede ocurrir mediante varios mecanismos. Por ejemplo, la neutralización directa o indirecta del virus infeccioso a través de anticuerpos y fagocitosis se ha propuesto como un mecanismo principal de defensa inmunológica contra la invasión viral (19). La introducción de la tecnología de anticuerpos monoclonales (AcMs) ayuda a entender los mecanismos de neutralización viral (20), caracteriza la extensa diversificación antigénica de los virus y define los lugares antigénicos de la superficie viral (6, 7, 9).

Numerosas agrupaciones utilizan AcMs para entender la complejidad antigénica de los aftovirus. Análisis secuenciales de mutantes resistentes de AcMs de aftovirus tipo O (cepa O₁K) (12), identificaron cuatro sitios antigénicos, uno de los cuales

corresponde a la región sensible a la tripsina en la secuencia aminoácida 140-160 y al residuo 208 del extremo C del VP₁. Un segundo sitio, involucrando los aminoácidos 43 y 44, fue identificado también en el VP₁. El tercero estaba asociado a los residuos de la secuencia de los aminoácidos 70-73, 75, 77 y 131 del VP₂ y el último, en el residuo 58 del VP₃ (12).

Para el aftovirus tipo A (cepa A₁₀ Holanda) (23) se informaron cuatro sitios antigénicos: el primero fue sensible a la tripsina e incluyó la secuencia 140-160 del VP₁, mientras que el segundo no fue sensible a la tripsina e incluyó principalmente el VP₃. Se encontraron otros dos sitios menos significativos en los residuos 169 del VP₁ y en el extremo C del VP₁.

Los conocimientos actuales sobre los epítopes discontinuos de los sitios antigénicos del serotipo C (cepa C-S8) de la fiebre aftosa que son independientes del sitio A (VP₁ 140-160), fueron revisados recientemente (14). Uno de estos sitios, llamado sitio C, corresponde al extremo carboxi del segmento del VP₁. Aunque en el aftovirus tipo

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

O los sitios A y C en conjunto forman un dominio (*domain*) discontinuo (sitio 1), en los virus tipo C aparecen como sitios continuos independientes. Otro sitio en este último virus, localizado cerca del eje de la cápside de la tercera generación, es un dominio antigénico discontinuo que aparece como uno de los principales sitios antigénicos (13), mientras que un tercer sitio antigénico independiente está localizado cerca del eje de la cápside de la quinta generación. Además, Mateu et al. (14,15) describieron por lo menos otros 14 epítopes continuos diferentes en el sitio A y dos epítopes en el sitio C, utilizando un panel de 18 AcMs neutralizantes, algunos de los cuales se incluyen en este estudio.

Un grupo de AcMs dirigidos contra diferentes sitios antigénicos puede ser muy útil para el estudio de la antigenicidad de las vacunas. Además, pueden transformarse en una importante herramienta epidemiológica para el estudio de relacionamientos antigénicos entre las cepas de virus de vacuna y los virus de fiebre aftosa que aparecen en el campo y ayudan en la definición de la estrategia adecuada de las vacunas.

Este informe describe la producción de series de AcMs contra los aftovirus tipos O, A y C. Su caracterización preliminar se discute con base en los resultados obtenidos con pruebas de virus-neutralización y de seroprotección y por su reacción con proteínas virales en EITB.

MATERIALES Y MÉTODOS

Virus: En este estudio se emplearon las cepas de virus utilizadas para la formulación de vacunas contra la fiebre aftosa en la mayoría de los países de América del Sur: O₁ Campos Br/58, A₂₄ Cruzeiro Br/55 y C₃ Indaial Br/71. Normalmente, las preparaciones virales fueron inactivadas con BEA (4) y purificadas en un gradiente de cloruro de cesio.

Inmunización: Se inocularon, semanalmente, ratones Balb/c machos de 6 a 10 semanas de edad por vía intraperitoneal con 40/μg de preparación viral purificada, inactivada o sin inactivar. Para la

primera inoculación, se emulsionaron muestras de virus en adyuvante de Freund completo. Para la segunda y tercera inoculaciones se utilizó adyuvante de Freund incompleto. La cuarta inoculación fue administrada sin adyuvante, dos días antes de la fusión.

Anticuerpos monoclonales: Bazos de ratones inmunizados, removidos asépticamente, se lavaron y maceraron en medio Eagle modificado Dulbecco (DMEM). Las células fueron cosechadas y concentradas por centrifugación a 1000g durante 8 minutos a 4°C. Los *pellets* se trataron con solución tampón ACK (NH₄Cl 0,15 M; KHCO₃ 0,01M; Na₂EDTA 0,01 M) por un minuto en baño frío y después neutralizados con 40 ml de DMEM conteniendo suero fetal bovino (5%) y heparina (5 UI/ml). Posteriormente, la suspensión celular fue centrifugada y los *pellets* resuspendidos en DMEM.

Células de mieloma SP₂/0 Ag 14 en su fase de crecimiento exponencial se cultivaron en un medio SP2 (DMEM con 2mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio, adicionado de 15% de suero fetal bovino), y fueron lavadas y resuspendidas en DMEM. Las células de bazo y de mieloma se mezclaron en una proporción de 4:1 respectivamente y fueron centrifugadas. Los *pellets* de células se dispersaron cuidadosamente y las fusiones se realizaron adicionando 1 ml de polietilenglicol 1500 (NBS Biologicals*) (PEG 1500 50% p/v en DMEM y 5% dimetilsulfóxido) para cada 1,8 x 10⁸ células, mezclando por rotación durante los dos minutos siguientes. Inmediatamente después, se adicionaron, lentamente, 20 ml de DMEM por un período de tres minutos, usando un cuentagotas. Las células suspensas se pipetearon cuidadosamente y se incubaron a 37°C por 15 minutos en baño de agua.

Después de la incubación, los sobrenadantes se trasladaron a tubos limpios, los volúmenes se ajustaron a 40 ml con DMEM y se centrifugaron. Los *pellets* fueron resuspendidos en un medio

* La mención en este trabajo de firmas comerciales o de sus productos es solo para identificación y no constituye endoso por los autores o sus organizaciones.

HAT (SP2 con hipoxantina 0,1 mM, aminopterina 0,0004 mM y timidina 0,016 mM) con $2,5 \times 10^6$ células/ml, aproximadamente, y distribuidas en placas de 96 pocitos conteniendo 0,2 ml/pocito. Las placas se colocaron en una incubadora a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

El crecimiento del hibridoma se examinó diariamente, hasta que se observaron aproximadamente 300 células en la colonia de hibridomas. Los sobrenadantes se recolectaron y analizaron por la prueba ELISA, como se describe más abajo, buscando anticuerpos específicos. Hibridomas positivos fueron clonados tres veces por la técnica de dilución limitante. Los hibridomas se mantuvieron en un medio de cultivo HT (medio SP2 con 0,1 mM de hipoxantina y 0,016 mM de timidina).

Prueba ELISA: Los hibridomas se sometieron a pruebas ELISA según los métodos descritos (2). Resumiendo, las placas ELISA (Nunc Immunoplates*) se cubrieron con suero hiperinmune de conejo específico a cada tipo de aftovirus (O, A y C), para que actuaran como anticuerpos de captura. En cada placa se colocaron aftovirus homólogos a cada anticuerpo de captura y se incubaron. Después de la incubación y los correspondientes lavados, los sobrenadantes de cada cultivo de hibridoma se sometieron a reacción con el virus homólogo, por 30 minutos, a 37°C.

Las reacciones positivas se detectaron adicionando un conjugado de inmunoglobulina caprina antiratón con peroxidasa de rabanita y desarrollándola con dihidrocloruro de ofenilenediamina.

Caracterización de anticuerpos monoclonales: Los isótipos de AcM se determinaron por la prueba de inmunodifusión en gel de agar (IDGA), utilizando antisuero específico para cada isótipo.

Las concentraciones de AcMs se determinaron por IDGA como se describió (22). En resumen, se preparó agarosa al 1% en 10 mM de Tris-HCl, 140 mM de NaCl y 0,1% de NaN₃. Después de la fusión de la agarosa, se adicionaron 90 µg de IgG bovina antiratón por cada 12 ml de la solución de agarosa a 40-50°C, y fue vertida en placas Petri de 10 cm de diámetro. Se hicieron siete

pocitos en cada placa y se llenaron con 10 µl de los AcMs correspondientes. Las concentraciones de AcMs se estimaron midiendo el halo de precipitación, comparándolo con padrones basados en datos obtenidos en concentraciones de AcMs conocidos (0 µg; 0,2 µg; 0,4 µg; 0,8 µg).

La capacidad de los AcMs para neutralizar la infecciosidad de los virus *in vitro* e *in vivo* fue comprobada por pruebas de virusneutralización (VNT) y de seroprotección (MPT), respectivamente. Para la VNT (10), se distribuyeron suspensiones de cultivo de células IBRS-2, conteniendo 3×10^5 células/ml, en cantidades de 0,1 ml, en 96 pocitos y se incubaron a 37°C por 24 horas, en incubadora con CO₂.

Cuatro soluciones de la cuarta generación de AcMs positivos se incubaron con virus previamente titulados (100 DICT₅₀) a 37°C por 1 hora. Esta mezcla de virus y AcM se distribuyó en cantidades de 0,1 ml sobre la camada de cultivo celular. Los títulos de AcMs se expresaron como el log₁₀ de la recíproca de la dilución más baja de AcM que permitió la formación de placas.

La prueba de MPT se realizó como descrito (8). En resumen, ratones lactantes de 4 a 6 días de edad se inocularon por vía subcutánea con 0,1 ml de AcMs sin diluir. Una hora más tarde, se les inoculó por vía intraperitoneal con 0,05 ml de cuatro diluciones seriales de virus de la décima generación (10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ y 10⁻⁵). La DI₅₀ de los virus en presencia de AcMs se calculó por el método Reed Muench y el resultado se expresó como el índice de seroprotección. Los sueros de control positivos y negativos y las titulaciones de virus se incluyeron en los procedimientos VNT y MPT. Los resultados se aceptaron solo cuando estos controles estaban en concordancia con los títulos padrones previamente establecidos.

Para determinar la reacción de los AcMs con la proteína estructural del virus, se realizó una prueba EITB según el procedimiento descrito en el manual técnico del "Mini Trans-Blot BIORAD*". Las proteínas estructurales del virus se separaron en SDS-PAGE con 10% de acrilamida/bisacrilamida. Para cada gel se utilizaron 100 µg de virus purificado en un gradiente de cloruro de cesio y se trasladaron a membranas de nitrocelulosa. Se usó

una solución de albúmina de suero bovino (BSA) al 2% en PBS (0,136 M NaCl; 0,002 M KCl; 0,01 M Na_2HPO_4 ; 0,001 M KH_2PO_4), para saturar membranas de nitrocelulosa durante la noche, a 5°C. Tiras de membranas de nitrocelulosa saturadas se sometieron a reacción con cada sobrenadante de AcM diluido al 1:2 en PBS con 2% de BSA (tampón diluyente) y fueron incubadas a 25°C durante dos horas bajo constante agitación. Posteriormente, las tiras de nitrocelulosa se lavaron tres veces con PBS conteniendo 0,05% de Tween 20, se adicionó un conjugado de inmunoglobulina bovina antiratón con peroxidasa de rabanito y esta preparación fue incubada por una hora. La reacción se realizó con 4-cloro-1-naftol (16).

RESULTADOS

Anticuerpos monoclonales: El proceso de inmunización con virus vivos y/o inactivados y purificados de la fiebre aftosa provocó una buena inmunidad en ratones, contra cada cepa del virus. Sin embargo, la inoculación usando virus sin inactivar produjo un número mayor de hibridomas positivos. Las fusiones resultaron en 120 líneas de hibridomas celulares secretando anticuerpos continuamente. De estos, 35 fueron hibridomas específicos para O₁ Campos, 58 para A₂₄ Cruzeiro y 27 para C₃ Indaial.

Los datos de 20 AcMs contra cada cepa de virus se muestran en los cuadros 1, 2 y 3. Fueron seleccionados entre todos los AcMs obtenidos en este estudio, basados en sus características (este informe) y su falta de reacción cruzada con otras cepas de aftovirus de un serotipo diferente (datos no mostrados).

Las colonias de hibridomas fueron clonadas para certificar la homogeneidad y estabilidad en las líneas de hibridomas celulares. En cada caso, se confirmó la buena capacidad de secreción de anticuerpos de las líneas de hibridomas celulares.

Caracterización de los anticuerpos monoclonales: En los cuadros 1, 2, y 3 se muestran los isotipos de AcM. Todos los isotipos IgG3 fueron capaces de neutralizar la infecciosidad del virus en ratones

lactantes. La única excepción fue el AcM 7JA1, que mostró reacción cruzada con los virus O y A.

Las concentraciones de AcMs por IDGA mostraron grandes variaciones en la concentración de AcMs de los sobrenadantes de los cultivos de hibridoma (cuadros 1, 2 y 3). Estas diferencias fueron inherentes a cada hibridoma, aunque es posible que el manejo de los cultivos de hibridoma haya tenido alguna influencia en la concentración de AcMs.

Se detectaron reacciones cruzadas en las pruebas ELISA. Los AcMs 7EE6 y 7JA1, originarios de la cepa C₃ Indaial, también tuvieron reacciones variables con los virus O₁ Campos y A₂₄ Cruzeiro (figura 1). De estos dos AcMs, solo el 7EE6 mostró títulos altos en las pruebas de seroneutralización y

Cuadro 1. Propiedades de los AcMs para el aftovirus tipo O

MONO-CLONAL	ISOTIPO	CONC ^a	VNT ^b	MPT ^c	EITB ^d
11HC10	K/IgG3	—	> 3,50	4,27	VP1 ^e
11AD6	K/IgG2a	186	< 1,20	2,35	CONF ^f
12BB5	K/IgG3	162	< 1,20	3,25	CONF.
12FA5	K/—	10	< 1,20	0,88	CONF.
12DB7	K/IgG2a	99	1,90	2,83	CONF.
12GG11	K/IgG2a	118	< 1,20	0,00	CONF.
12EH6	K/IgG1	118	< 1,20	0,06	CONF.
12FG2	K/IgM	—	< 1,20	0,38	CONF.
36AF8	K/—	—	< 1,20	—	VP1
12CA12	K/IgG1	47	< 1,20	—	CONF.
13EG1	K/IgG2a	118	< 1,20	0,00	CONF.
13EC5	K/IgG1	108	< 1,20	0,00	CONF.
13DG11	K/IgM	—	< 1,20	0,31	CONF.
34CH4	K/—	33	< 1,20	0,50	CONF.
36AC6	K/IgM	—	> 3,60	2,50	CONF.
36BE8	K/Ig2a	—	1,90	—	VP1
36CC2	K/IgG2a	129	< 1,20	< 1,25	CONF.
36BB11	K/IgG1	108	< 1,20	—	CONF.
36AA8	K/IgG2a	118	< 1,20	< 1,25	CONF.
36AD5	K/IgG2a	186	< 1,20	< 1,25	CONF.

^a Concentración de AcMs determinada por la prueba de inmunodifusión en gel de agar.

^b Títulos en pruebas de virusneutralización.

^c Índice de seroprotección, determinado por pruebas de seroprotección.

^d Prueba de EITB.

^e Reacciones positivas y ^fnegativas con proteínas de virus desnaturalizados determinadas por EITB.

- No determinado.

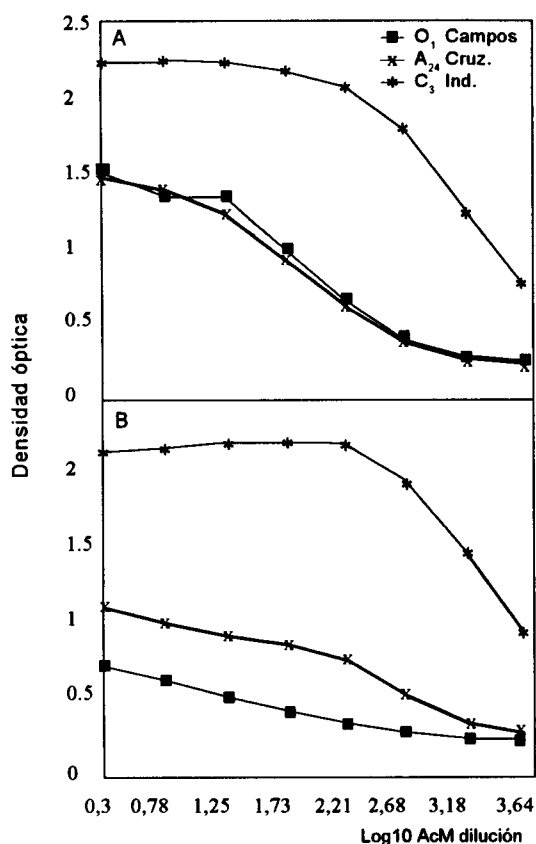


Figura 1. Reacción de AcMs 7EE6 (A) y 7JA1 (B) contra virus homólogos (C₃ Indaial) y heterólogos (O₁ Campos y A₂₄ Cruzeiro) en pruebas ELISA

seroprotección con virus homólogos (cuadro 3). La reacción cruzada con 7EE6 en VNT y MPT resultó en títulos de <1,20 y 1,52 respectivamente para O₁ Campos y de <1,20 y 0,55 para A₂₄ Cruzeiro.

La capacidad de los AcMs para neutralizar la infecciosidad viral en cultivos de tejidos se estudió por VNT (cuadros 1, 2 y 3). El virus A₂₄ Cruzeiro pareció inducir, principalmente, los AcMs de bajos títulos de neutralización. Exceptuando el 31DF4, todos los títulos de AcMs del A₂₄ Cruzeiro fueron de 1,80 o menos en la VNT. Por el contrario, con la MPT el A₂₄ Cruzeiro indujo un número más alto de AcMs con alto índice de seroprotección. 17 de los AcMs mostraron un título MPT de 2,00 o más (cuadro 2). La cepa del virus O₁ Campos presentó

poca capacidad para generar AcMs con propiedades protectoras o neutralizantes, especialmente si comparada con los AcMs obtenidos de los virus A₂₄ Cruzeiro y C₃ Indaial.

Los datos sobre la capacidad de los AcMs para proteger ratones por MPT se muestran en los cuadros 1, 2 y 3. La neutralización de la infecciosidad de los virus por MPT mostró resultados diferentes de los observados en VNT. Así, muchos AcMs que no neutralizaron la infecciosidad del virus en cultivos de tejidos, en MPT protegieron ratones lactantes.

De las proteínas virales definidas por los AcMs en EITB (cuadros 1, 2 y 3), una media de 50% de los epitopes identificados por los AcMs

Cuadro 2. Propiedades de los AcMs para el aftovirus tipo A

MONO-CLONAL	ISOTIPO	CONC ^a	VNT ^b	MPT ^c	EITB ^d
16EC11	K/-	118	< 1,20	3,00	VP1*
16EC2	K/IgM	-	< 1,20	3,00	CONF ^f
17CA6	K/IgG2a	33	< 1,20	1,25	CONF.
31DC7	K/IgG3	140	< 1,20	2,24	VP1
31DE3	K/-	20	< 1,20	3,00	VP1
31DB8	K/-	162	< 1,20	4,02	VP1
31DF4	K/IgG3	33	3,40	4,03	VP1
31EF12	K/IgG2a	15	1,80	4,25	CONF.
31EH2	K/-	47	1,50	2,75	CONF.
31ED1	K/IgG2a	47	1,40	4,50	CONF.
31EE8	K/IgG2a	63	1,60	1,50	CONF.
31EA12	K/IgG2a	-	1,30	2,00	CONF.
31EG9	K/IgG2a	63	1,30	4,65	CONF.
31EB2	K/IgG2a	63	1,40	4,25	CONF.
31FE7	K/-	162	< 1,20	3,10	VP1
31FA4	K/IgG2a	150	< 1,20	3,15	VP1
31GA6	K/IgG3	70	< 1,20	3,85	CONF.
31GA3	K/IgG3	118	< 1,20	3,35	VP1
32AA5	K/Ig2a	140	< 1,20	0,85	VP1
32DH3	K/IgG2a	186	< 1,20	4,25	CONF.

^a Concentración de AcMs determinada por la prueba de inmunodifusión en gel de agar.

^b Títulos en pruebas de virusneutralización.

^c Índice de seroprotección, determinado por pruebas de seroprotección.

^d Prueba de EITB.

* Reacciones positivas y ^fnegativas con proteínas de virus desnaturalizados determinadas por EITB.

- No determinado.

Cuadro 3. Propiedades de los AcMs para el aftovirus tipo C

MONO-CLONAL	ISOTIPO	CONC ^a	VNT ^b	MPT ^c	EITB ^d
1BH8	K/-	26	1,90	2,22	VP1*
2LC9	K/-	-	< 1,20	1,70	VP1
7AB5	K/IgG3	250	3,50	> 4,75	VP1
7AH1	K/IgG2b	211	< 1,20	0,60	VP1
7BH11	K/IgG2b	236	< 0,61	1,25	CONF ^e
7CA8	K/IgG3	295	> 3,60	3,25	VP1
7CH1	K/IgG1	200	1,90	3,75	VP1
7CA11	K/IgG1	160	3,50	3,60	VP1
7DH4	K/IgG2b	165	< 1,20	1,40	CONF.
7DG11	K/IgG1	-	< 0,61	0,21	CONF.
7DF10	K/IgG1	120	1,50	4,32	CONF.
7EE6	K/IgG3	160	3,40	3,07	VP1
7EG3	K/IgG1	-	< 1,20	0,71	CONF.
7FC4	K/IgG2a	256	< 1,20	0,75	CONF.
7FC12	K/IgG1	104	3,30	3,00	VP1
7JA1	K/IgG3	90	< 0,61	0,46	VP1
7JD1	K/IgG1	200	> 3,61	3,50	VP1
7LA5	K/IgG3	90	< 1,20	4,25	CONF.
7DH9	K/IgG2a	295	< 1,20	0,60	CONF.
7LE9	K/IgG1	-	-	3,58	CONF.

^a Concentración de AcMs determinada por la prueba de inmunodifusión en gel de agar.

^b Títulos en pruebas de virusneutralización.

^c Índice de seroprotección, determinado por pruebas de seroprotección.

^d Prueba de EITB.

^e Reacciones positivas y ^fnegativas con proteínas de virus desnaturalizados determinadas por EITB.

- No determinado.

generados por los virus A₂₄ Cruzeiro y C₃ Indaial, correspondieron a epítopes no conformacionales en VP₁. Por el contrario, los epítopes identificados por la mayoría de los AcMs generados por la cepa O₁ Campos, resultaron ser conformacionales. Solo los AcMs 11HC10, 36AF8 y 36BE8 reaccionaron con la secuencia lineal VP₁ en EITB.

DISCUSIÓN

Todos los AcMs descritos en este informe contenían cadenas Kappa livianas y la mayoría de las cadenas pesadas eran del isotipo IgG. Esta característica refleja el hecho de que 95% de las

moléculas de inmunoglobulina de ratones contienen cadenas Kappa livianas y que los procedimientos de inmunización posteriores, normalmente resultan en una respuesta IgG (11).

Los AcMs inducidos por O₁ Campos, que reconocieron la secuencia lineal del VP₁, solo fueron revelados por los AcMs 11HC10, 36AF8 y 36BB11. Otros AcMs fueron dirigidos a epítopes conformacionales en la superficie del virión. Se sugiere que el sitio neutralizante principal de O₁ Campos es más dependiente conformacional que los observados en los virus A₂₄ Cruzeiro y C₃ Indaial (6,13,24).

En un estudio previo (15), los epítopes reconocidos por los AcMs del C₃ Indaial 7EE6 y 7JA1 en la región VP₁ correspondieron, respectivamente, a los aminoácidos 138 a 156 (sitio A) y 192 a 209 (sitio C). En este estudio se descubrió que estos AcMs tienen reacción cruzada con los virus O₁ Campos y A₂₄ Cruzeiro (figura 1). El AcM 7EE6 presentó actividad neutralizante en la prueba de seroprotección sobre virus homólogos y también sobre los virus heterólogos O₁ Campos y A₂₄ Cruzeiro. Aunque los títulos de reacción cruzada de los AcMs fueron considerados bajos, estos hallazgos sugieren similitudes entre los epítopes neutralizables definidos por el AcM 7EE6, tanto en los virus homólogos como en los otros dos tipos de virus heterólogos. Los estudios continúan para elucidar mejor estos hallazgos.

El experimento *in vitro* de VNT es selectivo para un tipo particular de anticuerpo, capaz de neutralizar la infecciosidad viral, principalmente en altas concentraciones (17). Esto es contrario a lo que realmente sucede en un hospedero natural o en una prueba de seroprotección *in vivo*, donde intervienen otros intermediarios inmunológicos, como opsonización de anticuerpos y anticuerpos con complemento, que permiten la fagocitosis de partículas virales (18). Además, las clases y subclases de anticuerpos juegan un rol importante sobre la activación complementaria y la interacción de anticuerpos con receptores Fc en macrófagos o en neutrófilos (21). De hecho, muchos AcMs con títulos VNT muy bajos tuvieron un alto índice de seroprotección. La situación inversa no se verificó. Esto tiene implicaciones importantes para expe-

rimentos y ensayos en que el título está relacionado a la capacidad protectora de un antígeno. En cuanto la prueba de seroprotección generalmente es considerada la más relevante en la protección de bovinos, se puede decir que un título alto en ratones de un determinado AcM puede reflejar las peculiaridades de un isótipo de murino particular y sus interacciones con fagocitos de murino en lugar de la situación en el ganado.

Las relaciones entre cepas de aftovirus pueden ser claramente establecidas en base a la secuencia de nucleótidos (5). Aunque esta técnica puede ser una herramienta epidemiológica útil, tiene sus limitaciones para predecir una antigenicidad viral, por ejemplo, la determinación de una estrategia vacunal (3). La sustitución de apenas un aminoácido dentro de la región 138-156 del VP₁ muestra que modifica la especificidad antigénica del virus (15) y que variaciones en dominios diferentes del sitio antigénico A también pueden ser relevantes sobre toda la diversidad antigénica del aftovirus en el campo (9).

En general, estas consideraciones restringen la importancia potencial de los AcMs descritos en este informe para uso en la caracterización antigénica de aftovirus obtenidos tanto de brotes en el campo como en cepas de vacunas. Estas informaciones son particularmente valiosas para identificar los 4 ó 5 sitios antigénicos de la fiebre aftosa descritos (6, 7, 9, 12, 13, 23).

Además, con el uso de AcMs descritos en este informe, se encontraron evidencias (14) de que una limitada variación de secuencias en los sitios antigénicos independientes de los aftovirus, que contienen varios epítopes, puede constituir la base para la diversidad antigénica de estos virus en el campo. Finalmente, algunos de estos AcMs probaron su utilidad en el proceso de producción de vacunas contra la fiebre aftosa (1, 2), cuantificando masas antigénicas y determinando el ajuste entre antígenos activados y virus de desafío.

RECONOCIMIENTOS

Agradecemos al Dr. Horacio Barahona por su parecer y apoyo y al Dr. Alberto K. Ramalho por

la realización de las pruebas de virusneutralización y seroprotección.

Además agradecemos a los Drs. Luis Enjuanes y Mauricio G. Mateu, del Centro de Biología Molecular "Severo Uchoa", España, por su valiosa asistencia en la preparación de las primeras fases de los hibridomas y su caracterización.

REFERENCIAS

1. ALONSO, A., DARSIE, G.C., TEIXEIRA, A., C., REIS J.L., MESQUITA, J.A. Application of monoclonal antibodies to quality control of foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine*, 12 (8): 682-686, 1994.
2. ALONSO, A., GOMES, M.P.D., RAMALHO, A.K., ALLENDE, R., BARAHONA, H., SÖNDAHL, M.S., OSORIO, F.A. Characterization of foot-and-mouth disease virus by monoclonal antibodies. *Viral Immunol.*, 6 (3): 219-228, 1993.
3. ARMSTRONG, R.M., SAMUEL, A.R., CARPENTER, W.C., KANT, R., KNOWLES, N.J. A comparative study of serological and biochemical methods for strain differentiation of foot-and-mouth disease type A viruses. *Vet. Microbiol.*, 38: 285-298, 1994.
4. 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.
5. BECK, E., STROHMAIER, K. Subtyping of European foot-and-mouth disease virus strains by nucleotide sequence determination. *J. Virol.*, 68: 1621-1629, 1987.
6. BOLWELL, C., CLARKE, B.E., PARRY, N.R., OULDRIDGE, E.J., BROWN, F., ROWLANDS, D.J. Epitope mapping of foot-and-mouth disease virus with neutralizing monoclonal antibodies. *J. gen. Virol.*, 70: 59-68, 1989.
7. CROWTHER, J.R., FARIAS, S., CARPENTER, W.C., SAMUEL, A.R. Identification of a fifth neutralizable site on type O foot-and-mouth disease virus following characterization of single and quintuple monoclonal antibody escape mutants. *J. gen. Virol.*, 74: 1547-1553, 1993.
8. CUNHA, R.G., BAPTISTA JUNIOR, J.A., SERRÃO, U.M., TORTUELLA, 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.
9. FEIGELSTOCK, D., MATEU, M.G., PICCONE, M.E., DE SIMONE, F., BROCCCHI, E., DOMINGO, E., PALMA E.L. Extensive antigenic diversification of foot-and-mouth disease virus by amino acid substitutions outside the major antigenic site. *J. gen. Virol.*, 73: 3307-3311, 1992.
 10. FERREIRA, M.E.V. Microtiter neutralization test for the study of foot-and-mouth disease antibodies. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 21-22: 21-24, 1976.
 11. GODING, J.W. *Monoclonal antibodies: principle and practice*. London, Academic Press, 1983. 276p.
 12. KITSON, J.D.A., MCCAHERN, D., BELSHAM, G.J. 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 protein in four antigenic sites. *Virology*, 179: 26-34, 1990.
 13. LEA, S., HERNÁNDEZ, J., BLAKEMORE, W., BROCCCHI, E., CURRY, S., DOMINGO, E., FRY, E., ABU-GHAZLEH, R., KING, A., NEWMAN, J., STUART, D., MATEU, M.G. The structure and antigenicity of a type C foot-and-mouth disease virus. *Structure*, 2: 23-139, 1994.
 14. MATEU, M.G., HERNANDEZ, J., MARTINEZ, M.A., FEIGELSTOCK, D., LEA, S., PEREZ, J.J., GIRALT, E., STUART, D., PALMA, E. L., DOMINGO, E. Antigenic heterogeneity of foot-and-mouth disease virus serotype in field is mediated by very limited sequence variation at several antigenic sites. *J. Virol.*, 68 (3): 1407-1417, 1994.
 15. MATEU, M.G., MARTINEZ, M.A., CAPUCCI, L., ANDREU, D., GIRALT, E., SOBRINO, F., BROCCCHI, E., DOMINGO, E. 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: 629-637, 1990.
 16. MATEU, M.G., SILVA, J.L., ROCHA, E., BRUM, D.L., ALONSO, A., ENJUANES, L., DOMINGO, E., BARAHONA, H. Extensive antigenic heterogeneity of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *Virology*, 167: 113-124, 1988.
 17. MCCULLOUGH, K.C., CROWTHER, J.R., BUTCHER, R.N., CARPENTER, W.C., BROCCCHI, E., CAPUCCI, L., DE SIMONE, F. Immune protection against foot-and-mouth disease virus studied using virus-neutralizing and non-neutralizing concentrations of monoclonal antibodies. *Immunology*, 58: 421-428, 1986.
 18. MCCULLOUGH, K.C., DE SIMONE, F., BROCCCHI, E., CAPUCCI, L., CROWTHER, J.R., KIHIM, U. Minireview: protective immune response against foot-and-mouth disease. *J. Virol.*, 66 (4): 1835-1840, 1992.
 19. MCCULLOUGH, K.C., PARKINSON, D., CROWTHER J.R. Opsonization-enhanced phagocytosis of foot-and-mouth-disease virus. *Immunology*, 65: 187-191, 1988.
 20. MCCULLOUGH, K.C., SMALE, C.J., CARPENTER, W.C., CROWTHER, J.R., BROCCCHI, E., DE SIMONE, F. Conformational alteration in foot-and-mouth disease virus virion capsid structure after complexing with monospecific antibody. *Immunology*, 60: 75-82, 1987.
 21. MULCAHY, G., GALE, C., ROBERTSON, P., IYISAN, S., DIMARCHI, R.D., DOEL, T.R. Isotype responses of infected, virus-vaccinated and peptide-vaccinated cattle to foot-and-mouth disease virus. *Vaccine*, 8 (3): 349-256, 1990.
 22. STAVE, W., CARD, J.L., MORGAN, D.O. Analysis of foot-and-mouth disease virus type O Brugge neutralization epitopes using monoclonal antibodies. *J. gen. Virol.*, 67: 2083-2092, 1986.
 23. THOMAS, A.A.M., WOORTMEIJER, R.J., PUJ, W., BARTELING, S.J. Antigenic sites on foot-and-mouth disease virus type A10. *J. Virol.*, 62 (8): 2782-2789, 1988.
 24. XIE, Q.C., MCCAHERN, 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.

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS

J.L. da SILVA, M.M. KANASHIRO, D.L. BRUM

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

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

Summary. Monoclonal antibodies (MAbs) produced against foot-and-mouth disease virus (FMDV) types O, A and C are described. The preliminary characterization is discussed in terms of virus neutralization and mouse protection test results and the reactivity of MAbs in enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assays with the denatured protein of the virus. Some MAbs which did not neutralize virus infectivity in tissue culture were able to neutralize virus infectivity in suckling mice. The MAbs designated as 7EE6 and 7JA1 which originated from C₃ Indaial virus cross-reacted with heterologous FMDV O₁ Campos and A₂₄ Cruzeiro viruses.

Protection of host animals against aphthovirus infection is a complex phenomenon which may occur by a variety of different mechanisms. For instance, neutralization of virus infectivity both directly or indirectly, by antibody and phagocytosis, has been proposed as a major mechanism of immunological defense against viral invasion (19). The introduction of monoclonal antibody (MAb) technology has helped understand the mechanisms of viral neutralization (20), characterize the extensive antigenic diversification of viruses and define the antigenic sites on the viral surface (6, 7, 9).

Many groups have been using MAbs to understand the antigenic complexity of foot-and-mouth disease viruses (FMDV). Sequence analyses of MAb resistant mutants of FMDV type O (strain O₁K) (12) have identified four antigenic sites, one of which corresponds to a trypsin-sensi-

tive region in the amino acid sequence 140-160 and the C-terminus residues 208 of VP₁. A second site, involving amino acids 43 and 44 has been identified also on VP₁, a third was found associated with the residues of the amino acid sequence 70-73, 75, 77 and 131 on VP₂, and the last one involved residue 58 on VP₃ (12).

For FMDV type A (strain A₁₀ Holland) (23), four antigenic sites were reported as follows: The first site was trypsin-sensitive and included the VP₁ 140 to 160 sequence, while the second one was trypsin-insensitive and included mainly VP₃. Two other minor sites were located near VP₁ 169 residues and on the C terminus of VP₁.

Current knowledge on the discontinuous epitopes of the C serotype of FMD (strain C-S8) antigenic sites which are independent of site A (VP₁ 140-160), has been reviewed recently (14). One of these sites, called site C, corresponds to the carboxy-terminal segment of VP₁. Although in FMDV type O, sites A and C form together a discontinuous domain (site 1), they appear as independent continuous sites in type C viruses.

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

Another site on the latter virus, located close to the capsid threefold axis, is a discontinuous antigenic domain which appears as a major antigenic site, (13) while a third independent antigenic site is located close to the capsid fivefold axis. Furthermore, at least 14 different continuous epitopes in site A, and 2 epitopes in site C have also been described by Mateu et al. (14,15), using a panel of 18 neutralizing MABs, some of which are included in the present study.

A set of MABs directed against the different antigenic sites may be useful for studying the antigenicity of vaccines. Equally, they may constitute an important epidemiological tool to study the antigenic relationships between FMD virus vaccine strains and FMD viruses emerging in the field and assist in the design of a proper vaccine strategy.

This report describes the production of a series of MABs against FMDV types O, A and C. Their preliminary characterization is discussed on the basis of results obtained with virus neutralization and mouse protection tests and by their reactivity with the virus proteins in enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB).

MATERIALS AND METHODS

Viruses: The virus strains used in the present study were those employed for the formulation of FMDV vaccine in most South American countries: O₁ Campos Br/58, A₂₄ Cruzeiro Br/55 and C₃ Indaial Br/71. Viral preparations were usually inactivated with BEA (4) and purified in a cesium chloride gradient.

Immunization: Six to ten week-old male Balb/c mice were inoculated weekly by the intraperitoneal route with 40 µg of purified inactivated or non-inactivated viral preparations. For the first inoculation, virus samples were emulsified in complete Freund's adjuvant, whereas incomplete Freund's adjuvant was used for the second and the third immunizations. The fourth inoculation was

administered without adjuvant, two days before the fusion.

Monoclonal Antibodies: Spleens removed aseptically from immunized mice were washed and macerated in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). Cells were harvested and concentrated by centrifugation at 1000 g for 8 minutes at 4°C. The pellet was treated with ACK buffer (NH₄Cl 0.15 M; KHCO₃ 0.01 M; Na₂EDTA 0.01 M) for 1 minute in an ice bath, and then neutralized with 40 ml of DMEM containing fetal calf serum (5%) and heparin (5 IU/ml). Subsequently, the cell suspensions were centrifuged and the pellets resuspended in DMEM.

SP₂/0 Ag 14 myeloma cells in the exponential growth phase were cultured in SP2 medium (DMEM with 2 mM of L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate and supplemented with 15% fetal calf serum), and then washed and resuspended in DMEM. The spleen cells and the myeloma cells were mixed at a 4:1 proportion respectively, and centrifuged. Cell pellets were dispersed gently and the fusions were carried out by adding of 1 ml of polyethyleneglycol 1500 (NBS Biologicals*) (PEG 1500 50% w/v in DMEM and 5% dimethylsulfoxide) for every 1.8 x 10⁸ cells, stirring by rotation for the next two minutes. Immediately thereafter, 20 ml of DMEM were added slowly over a period of three minutes using a dropper. Cell suspensions were gently pipetted and incubated at 37°C for 15 minutes in a water bath.

After incubation, supernatants were transferred to fresh tubes, the volumes adjusted to 40 ml with DMEM, and centrifuged. The cell pellets were resuspended in HAT medium (SP2 medium with hypoxanthine 0.1 mM, aminopterin 0.0004 mM, and thymidine 0.016 mM) with 2.5 x 10⁶ cells/ml approximately, and distributed in 96 well plates containing 0.2 ml/well. Well plates were placed at 37°C in an incubator with 5% CO₂ in a humid atmosphere.

* Mention in this paper of commercial firms or their products is for identification only and does not constitute endorsement by the authors or their organizations.

Hybridoma growth was monitored daily until approximately 300 cells were observed in the hybridoma colonies. Supernatants were collected and screened for specific antibodies by ELISA tests as described below. Positive hybridomas were cloned three times by the limiting dilution technique. Hybridomas were maintained in HT culture medium (SP2 medium with hypoxanthine 0.1mM and thymidine 0.016 mM).

ELISA test: Hybridoma products were assayed by ELISA tests, according to the methods described (2). Briefly, rabbit hyperimmune serum specific to each of the FMDV types (O, A and C) was coated to the ELISA plate (Nunc Immunoplate I*), to be used as capture antibody. FMDV homologous to each capture antibody was added to the plate and incubated. After the incubation and washing steps, supernatants from each hybridoma culture were reacted with the homologous virus for 30 minutes at 37°C.

Positive reactions were detected by adding goat anti-mouse horseradish peroxidase immunoglobulin conjugate and developing with O-phenylenediamine dihydrochloride.

Characterization of monoclonal antibodies: The MAb isotype was determined in agar gel immunodiffusion (AGID) tests, using antisera specific for each isotype.

MAb concentrations were determined by AGID as described elsewhere (22). Briefly, agarose (1%) was prepared in 10 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl and 0.1% NaN₃. After agarose fusion, 90 µg of goat anti-mouse IgG were added per 12 ml of the agarose solution at 40-50°C, and poured into Petri dishes with 10 cm diameters. Seven wells were made in each plate and filled with 10 µl of the corresponding MAbs. MAb concentrations were estimated by measuring the precipitation halo and then comparing it with a standard slope based on data obtained with known MAb concentrations (0 µg; 0.2 µg; 0.4 µg; 0.8 µg).

The ability of MAbs to neutralize virus infectivity *in vitro* and *in vivo* was assayed by virus neutralization (VNT) and mouse protection (MPT)

tests, respectively. For the VNT (10), IBRS-2 cell culture suspensions containing 3×10^5 cells/ml were distributed in 0.1 ml amounts in 96 microtiter wells and incubated at 37°C in a CO₂ incubator for 24 hours.

Four fourfold dilutions of the positive MAbs were incubated with pre-titrated virus (100 TCID₅₀) at 37°C for 1 hour. The MAb-virus mixture was then distributed in 0.1 ml amounts over the cell culture monolayer. MAb titers were expressed as the log₁₀ of the reciprocal of the lowest dilution of the MAb which permitted any plaque formation.

The MPT procedure was performed as described (8). In brief, 4-6 day-old suckling mice were inoculated subcutaneously with 0.1 ml of undiluted MAb. One hour later, they were inoculated intraperitoneally with 0.05 ml of four 10-fold virus serial dilutions (10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ and 10⁻⁵). The ID₅₀ of the virus in the presence of MAb was calculated by the Reed Muench method, and the results were expressed in terms of the mouse protection index. Positive and negative control sera and the virus titrations were included with the VNT and MPT procedures. The results were accepted only when these controls were in agreement with the standard titers determined previously.

For determining the MAb reactivity with the structural protein of the virus, an EITB assay was developed on the basis of the procedure described in the technical manual of the Mini Trans-Blot BIO-RAD supplier*. The virus structural proteins were separated in SDS-PAGE with 10% acrylamide/bisacrylamide. For each gel, 100 µg of virus purified in a cesium chloride gradient were used and transferred to nitrocellulose membranes. A 2% solution of bovine serum albumin (BSA) in PBS (0.136 M NaCl; 0.002 M KCl; 0.01 M Na₂HPO₄; 0.001 M KH₂PO₄) was used for saturating nitrocellulose membranes overnight at 5°C. Strips from the saturated nitrocellulose membranes were reacted with each MAb supernatant diluted 1:2 in PBS with 2% BSA (diluting buffer), and incubated at 25°C for 2 hours under constant agitation. Subsequently, nitrocellulose strips were washed three times with PBS containing 0.05% Tween 20, goat anti-mouse horseradish peroxidase immunoglobulin conjugate was added, and

the preparation was allowed to incubate for 1 hour. The reaction was developed with 4-chloro-1-naphthol (16).

RESULTS

Monoclonal Antibodies: The immunization procedure with purified and/or inactivated and live FMD viruses elicited a good immune response in mice against each FMDV strain used. However, immunization procedure using non-inactivated virus yielded higher numbers of positive hybridomas. The fusions resulted in 120 hybridoma cell lines continuously secreting antibody. Of these, 35 hybridomas were specific to O₁ Campos, 58 to A₂₄ Cruzeiro and 27 to C₃ Indaial.

Table 1. Properties of MAbs for FMDV type O

MONO-CLONAL	ISOTYPE	CONC ^a	VNT ^b	MPT ^c	EITB ^d
11HC10	K/IgG3	—	> 3.50	4.27	VP1*
11AD6	K/IgG2a	186	< 1.20	2.35	CONF ^f
12BB5	K/IgG3	162	< 1.20	3.25	CONF.
12FA5	K/—	10	< 1.20	0.88	CONF.
12DB7	K/IgG2a	99	1.90	2.83	CONF.
12GG11	K/IgG2a	118	< 1.20	0.00	CONF.
12EH6	K/IgG1	118	< 1.20	0.06	CONF.
12FG2	K/IgM	—	< 1.20	0.38	CONF.
36AF8	K/—	—	< 1.20	—	VP1
12CA12	K/IgG1	47	< 1.20	—	CONF.
13EG1	K/IgG2a	118	< 1.20	0.00	CONF.
13EC5	K/IgG1	108	< 1.20	0.00	CONF.
13DG11	K/IgM	—	< 1.20	0.31	CONF.
34CH4	K/—	33	< 1.20	0.50	CONF.
36AC6	K/IgM	—	> 3.60	2.50	CONF.
36BE8	K/Ig2a	—	1.90	—	VP1
36CC2	K/IgG2a	129	< 1.20	< 1.25	CONF.
36BB11	K/IgG1	108	< 1.20	—	CONF.
36AA8	K/IgG2a	118	< 1.20	< 1.25	CONF.
36AD5	K/IgG2a	186	< 1.20	< 1.25	CONF.

^a MAb concentration determined by Agar Gel Immunodiffusion test.

^b Titer in virus neutralization tests.

^c Mouse protection index, determined by mouse protection tests.

^d Enzyme-linked Immunelectrotransfer Blot assay.

^e Positive and ^f Negative reactions with denatured virus protein determined by EITB.

- Not determined.

Table 2. Properties of MAbs for FMDV type A

MONO-CLONAL	ISOTYPE	CONC ^a	VNT ^b	MPT ^c	EITB ^d
16EC11	K/—	118	< 1.20	3.00	VP1*
16EC2	K/IgM	—	< 1.20	3.00	CONF ^f
17CA6	K/IgG2a	33	< 1.20	1.25	CONF.
31DC7	K/IgG3	140	< 1.20	2.24	VP1
31DE3	K/—	20	< 1.20	3.00	VP1
31DB8	K/—	162	< 1.20	4.02	VP1
31DF4	K/IgG3	33	3.40	4.03	VP1
31EF12	K/IgG2a	15	1.80	4.25	CONF.
31EH2	K/—	47	1.50	2.75	CONF.
31ED1	K/IgG2a	47	1.40	4.50	CONF.
31EE8	K/IgG2a	63	1.60	1.50	CONF.
31EA12	K/IgG2a	—	1.30	2.00	CONF.
31EG9	K/IgG2a	63	1.30	4.65	CONF.
31EB2	K/IgG2a	63	1.40	4.25	CONF.
31FE7	K/—	162	< 1.20	3.10	VP1
31FA4	K/IgG2a	150	< 1.20	3.15	VP1
31GA6	K/IgG3	70	< 1.20	3.85	CONF.
31GA3	K/IgG3	118	< 1.20	3.35	VP1
32AA5	K/Ig2a	140	< 1.20	0.85	VP1
32DH3	K/IgG2a	186	< 1.20	4.25	CONF.

^a MAb concentration determined by Agar Gel Immunodiffusion test.

^b Titer in virus neutralization tests.

^c Mouse protection index, determined by mouse protection tests.

^d Enzyme-linked Immunelectrotransfer Blot assay.

^e Positive and ^f Negative reactions with denatured virus protein determined by EITB.

- Not determined.

Data on twenty MAbs against each virus strain are shown on tables 1, 2 and 3. They were selected from all of the MAbs obtained in this study, on the basis of their characteristics (this report), and their lack of cross reactivity with other FMDV strains of a different serotype (data not shown).

Hybridoma colonies were subjected to the cloning process to certify the homogeneity and stability of the hybridoma cell lines. In each case the good capacity of the hybridoma cell lines to secrete antibody was confirmed.

Characterization of Monoclonal Antibodies: The MAb isotypes are shown in tables 1, 2 and 3. All the IgG3 isotype MAbs showed ability to neutralize virus infectivity in suckling mice. The sole excep-

tion was 7JA1 MAb, which cross reacted with O and A viruses.

The MAb concentration, as determined by AGID revealed wide variations in the MAb concentration of the supernatants from the hybridoma cultures (tables 1, 2 and 3). These differences were inherent to each hybridoma, although the management of hybridoma cultures possibly had some influence in the MAb concentration.

Crossed reactions were detected in ELISA tests. MAbs 7EE6 and 7JA1, which originated from the C₃ Indaial strain, also reacted to differing extents with the O₁ Campos and A₂₄ Cruzeiro viruses (figure 1). Of these two MAbs, only 7EE6 gave high titers in the homologous serum neutral-

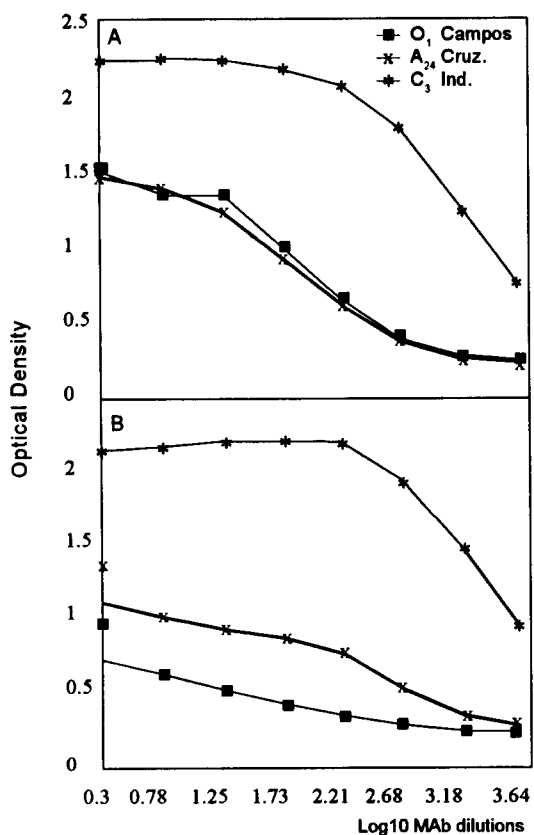


Figure 1. Reactivity of MAbs 7EE6 (A) and 7JA1 (B) against homologous (C₃ Indaial) and heterologous (O₁ Campos and A₂₄ Cruzeiro) viruses in ELISA tests

Table 3. Properties of MAbs for FMDV type C

MONO-CLONAL	ISOTYPE	CONC ^a	VNT ^b	MPT ^c	EITB ^d
1BH8	K/-	26	1.90	2.22	VP1*
2LC9	K/-	-	< 1.20	1.70	VP1
7AB5	K/IgG3	250	3.50	> 4.75	VP1
7AH1	K/IgG2b	211	< 1.20	0.60	VP1
7BH11	K/IgG2b	236	< 0.61	1.25	CONF ^e
7CA8	K/IgG3	295	> 3.60	3.25	VP1
7CH1	K/IgG1	200	1.90	3.75	VP1
7CA11	K/IgG1	160	3.50	3.60	VP1
7DH4	K/IgG2b	165	< 1.20	1.40	CONF.
7DG11	K/IgG1	-	< 0.61	0.21	CONF.
7DF10	K/IgG1	120	1.50	4.32	CONF.
7EE6	K/IgG3	160	3.40	3.07	VP1
7EG3	K/IgG1	-	< 1.20	0.71	CONF.
7FC4	K/IgG2a	256	< 1.20	0.75	CONF.
7FC12	K/IgG1	104	3.30	3.00	VP1
7JA1	K/IgG3	90	< 0.61	0.46	VP1
7JD1	K/IgG1	200	> 3.61	3.50	VP1
7LA5	K/IgG3	90	< 1.20	4.25	CONF.
7DH9	K/IgG2a	295	< 1.20	0.60	CONF.
7LE9	K/IgG1	-	-	3.58	CONF.

^a MAb concentration determined by Agar Gel Immunodiffusion test.

^b Titer in virus neutralization tests.

^c Mouse protection index, determined by mouse protection tests.

^d Enzyme-linked Immunelectrotransfer Blot assay.

^e Positive and ^f Negative reactions with denatured virus protein determined by EITB.

- Not determined.

ization and mouse protection tests (table 3). Cross reactivity in VNT and MPT with 7EE6, resulted in titers of <1.20 and 1.52 respectively, for O₁ Campos, and of <1.20 and 0.55 for A₂₄ Cruzeiro.

The ability of MAbs to neutralize viral infectivity in tissue culture was tested by the VNT (tables 1, 2 and 3). The A₂₄ Cruzeiro virus appeared to induce mostly low-titer neutralizing MAbs. With the exception of 31DF4, all of A₂₄ Cruzeiro MAbs titers were 1.80 or less in VNT. In contrast, A₂₄ Cruzeiro virus induced a higher number of MAbs with high mouse protection index. 17 of the MAbs showed an MPT titer of 2.00 or higher (table 2). The O₁ Campos virus strain presented poor ability to induce MAbs with neutralizing or protective properties, particularly when compared with

the MAbs obtained from A₂₄ Cruzeiro and C₃ Indaial viruses.

Data on ability of the MAbs to protect mice in MPT are shown in tables 1, 2 and 3. Neutralization of virus infectivity in MPT showed different results from those observed in VNT. Thus, many MAbs which did not neutralize virus infectivity in tissue culture, did protect suckling mice in MPT.

Of the virus proteins defined by the MAbs in EITB (tables 1, 2 and 3), an average of 50% of the epitopes identified by the MAbs elicited by A₂₄ Cruzeiro and C₃ Indaial viruses corresponded to non-conformational epitopes in VP₁. In contrast, the epitopes identified by most of MAbs elicited by O₁ Campos virus strain, were found to be conformational. Only MAbs 11HC10, 36AF8 and 36BE8 were found to react with the VP₁ linear sequence in EITB.

DISCUSSION

All of the MAbs described in this paper contained Kappa light chains and most of the heavy chains were of the IgG isotype. These characteristics reflect the facts that 95% of all mouse immunoglobulin molecules contain Kappa light chains, and that extended immunization procedures typically result in an IgG response (11).

The MAbs induced by O₁ Campos, which recognized the linear sequence of VP₁, were revealed only by MAbs 11HC10, 36AF8 and 36BB11. Other MAbs were directed to conformational epitopes on the virion surface. It is suggested that the major neutralizing site of O₁ Campos may be more conformation-dependent than those observed for A₂₄ Cruzeiro and C₃ Indaial viruses (6,13,24).

In a previous study (15), the epitopes recognized by the C₃ Indaial MAbs 7EE6 and 7JA1 on the VP₁ region corresponded, respectively, to the amino acids 138 to 156 (site A) and 192 to 209 (site C). In the present study, these MAbs were found to cross react with O₁ Campos and A₂₄ Cruzeiro viruses (figure 1). Neutralizing activity in MPT was observed for the homologous virus with the MAb 7EE6, and was recorded also for the heterolo-

gous O₁ Campos and A₂₄ Cruzeiro viruses. Although the MAb cross-reaction titers were considered low, these findings are suggestive of similarities amongst the neutralizable epitopes defined by 7EE6 MAb both in the homologous and the other two heterologous virus types. Studies are in progress to further clarify these findings.

The VNT *in vitro* assay is selective for a particular type of antibody, which is capable of neutralizing viral infectivity mainly at high concentrations (17). This is in contrast to what really happens in the natural host or in *in vivo* MPT, where other immunological mediators are involved, such as antibody opsonization and antibody plus complement, which enhance phagocytosis of viral particles (18). In addition, the antibody class and subclass play an important role in relation to complement activation and to the interaction of antibody with Fc receptors in macrophages or in neutrophils (21). In fact many MAbs with very low VNT titers had high MP index. The reverse situation was not seen. This has important implications for experiments and assays in which titer is related to protective capacity of an antigen. While the MPT is generally regarded to be the most relevant to protection in cattle it has to be said that a high titer in the mouse of a given MAb may reflect the peculiarities of a particular murine isotype and its interactions with murine phagocytes rather than the situation in cattle.

Relationships among FMDV strains can be established clearly on the basis of the nucleotide sequence (5). Although this technique may serve as a useful epidemiological tool, it has limitations for predicting viral antigenicity, for example in relation to determining vaccine strategy (3). A single amino acid substitution within the 138-156 region of VP₁ has been shown to modify the antigenic specificity of the virus (15) and variation in domains other than antigenic site A, may be also relevant to the overall antigenic diversity of FMDV in the field (9).

In general, these considerations stress the potential significance of the MAbs described in this report for use in the antigenic characterization of FMDV obtained from field outbreaks as well as vaccine strains. Information along these lines seems

particularly of value to identify the four or five antigenic sites of FMDV described (6, 7, 9, 12, 13, 23).

Furthermore, evidence was found (14) using MAbs described in this paper that a very limited sequence variation in the independent antigenic sites of FMDV, which contain several epitopes, may constitute the basis for FMDV antigenic diversity in the field. Finally, some of these MAbs have proven useful during the process of FMD vaccine production (1, 2), quantifying antigenic mass and for determining the fit between inactivated antigens and challenge viruses.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Horacio H. Barahona for his advice and support and Dr. Alberto K. Ramalho for carrying out the virus neutralization and mouse protection tests.

We also thank Drs. Luis Enjuanes and Mauricio G. Mateu, of Centro de Biología Molecular "Severo Uchoa", Spain, for their valuable assistance in preparing first stages of hybridomas and its characterization.

REFERENCES

- ALONSO, A., DARSIE, G.C., TEIXEIRA, A., C., REIS J.L., MESQUITA, J.A. Application of monoclonal antibodies to quality control of foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine*, 12 (8): 682-686, 1994.
- ALONSO, A., GOMES, M.P.D., RAMALHO, A.K., ALLENDE, R., BARAHONA, H., SÖNDAHL, M.S., OSORIO, F.A. Characterization of foot-and-mouth disease virus by monoclonal antibodies. *Viral Immunol.*, 6 (3): 219-228, 1993.
- ARMSTRONG, R.M., SAMUEL, A.R., CARPENTER, W.C., KANT, R., KNOWLES, N.J. A comparative study of serological and biochemical methods for strain differentiation of foot-and-mouth disease type A viruses. *Vet. Microbiol.*, 38: 285-298, 1994.
- 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.
- BECK, E., STROHMAIER, K. Subtyping of European foot-and-mouth disease virus strains by nucleotide sequence determination. *J. Virol.*, 68: 1621-1629, 1987.
- BOLWELL, C., CLARKE, B.E., PARRY, N.R., OULDRIDGE, E.J., BROWN, F., ROWLANDS, D.J. Epitope mapping of foot-and-mouth disease virus with neutralizing monoclonal antibodies. *J. gen. Virol.*, 70: 59-68, 1989.
- CROWTHER, J.R., FARIAS, S., CARPENTER, W.C., SAMUEL, A.R. Identification of a fifth neutralizable site on type O foot-and-mouth disease virus following characterization of single and quintuple monoclonal antibody escape mutants. *J. gen. Virol.*, 74: 1547-1553, 1993.
- CUNHA, R.G., BAPTISTA JUNIOR, J.A., SERRÃO, U.M., TORTUELLA, 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.
- FEIGELSTOCK, D., MATEU, M.G., PICCONE, M.E., DE SIMONE, F., BROCCCHI, E., DOMINGO, E., PALMA E.L. Extensive antigenic diversification of foot-and-mouth disease virus by amino acid substitutions outside the major antigenic site. *J. gen. Virol.*, 73: 3307-3311, 1992.
- FERREIRA, M.E.V. Microtiter neutralization test for the study of foot-and-mouth disease antibodies. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 21-22: 21-24, 1976.
- GODING, J.W. *Monoclonal antibodies: principle and practice*. London, Academic Press, 1983. 276p.
- KITSON, J.D.A., MCCAHERN, D., BELSHAM, G.J. 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 protein in four antigenic sites. *Virology*, 179: 26-34, 1990.
- LEA, S., HERNÁNDEZ, J., BLAKEMORE, W., BROCCCHI, E., CURRY, S., DOMINGO, E., FRY, E., ABU-GHAZLEH, R., KING, A., NEWMAN, J., STUART, D., MATEU, M.G. The structure and antigenicity of a type C foot-and-mouth disease virus. *Structure*, 2: 23-139, 1994.
- MATEU, M.G., HERNANDEZ, J., MARTINEZ, M.A., FEIGELSTOCK, D., LEA, S., PEREZ, J.J., GIRALT, E., STUART, D., PALMA, E. L., DOMINGO, E. Antigenic heterogeneity of foot-and-mouth disease virus serotype in field is mediated by very limited sequence variation at several antigenic sites. *J. Virol.*, 68 (3): 1407-1417, 1994.

15. MATEU, M.G., MARTINEZ, M.A., CAPUCCI, L., ANDREU, D., GIRALT, E., SOBRINO, F., BROCCHI, E., DOMINGO, E. 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*: 629-637, 1990.
16. MATEU, M.G., SILVA, J.L., ROCHA, E., BRUM, D.L., ALONSO, A., ENJUANES, L., DOMINGO, E., BARAHONA, H. Extensive antigenic heterogeneity of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *Virology*, *167*: 113-124, 1988.
17. MCCULLOUGH, K.C., CROWTHER, J.R., BUTCHER, R.N., CARPENTER, W.C., BROCCHI, E., CAPUCCI, L., DE SIMONE, F. Immune protection against foot-and-mouth disease virus studied using virus-neutralizing and non-neutralizing concentrations of monoclonal antibodies. *Immunology*, *58*: 421-428, 1986.
18. MCCULLOUGH, K.C., DE SIMONE, F., BROCCHI, E., CAPUCCI, L., CROWTHER, J.R., KIHM, U. Minireview: protective immune response against foot-and-mouth disease. *J. Virol.*, *66* (4): 1835-1840, 1992.
19. MCCULLOUGH, K.C., PARKINSON, D., CROWTHER J.R. Opsonization-enhanced phagocytosis of foot-and-mouth-disease virus. *Immunology*, *65*: 187-191, 1988.
20. MCCULLOUGH, K.C., SMALE, C.J., CARPENTER, W.C., CROWTHER, J.R., BROCCHI, E., DE SIMONE, F. Conformational alteration in foot-and-mouth disease virus virion capsid structure after complexing with monospecific antibody. *Immunology*, *60*: 75-82, 1987.
21. MULCAHY, G., GALE, C., ROBERTSON, P., IYISAN, S., DIMARCHI, R.D., DOEL, T.R. Isotype responses of infected, virus-vaccinated and peptide-vaccinated cattle to foot-and-mouth disease virus. *Vaccine*, *8* (3): 349-256, 1990.
22. STAVE, W., CARD, J.L., MORGAN, D.O. Analysis of foot-and-mouth disease virus type O Brugge neutralization epitopes using monoclonal antibodies. *J. gen. Virol.*, *67*: 2083-2092, 1986.
23. THOMAS, A.A.M., WOORTMELJER, R.J., PULJ, W., BARTELING, S.J. Antigenic sites on foot-and-mouth disease virus type A10. *J. Virol.*, *62*(8): 2782-2789, 1988.
24. XIE, Q.C., MCCAHERN, 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.

CARACTERIZACIÓN DETALLADA DE ALGUNOS ANTICUERPOS MONOCLONALES QUE RECONOCEN SITIOS ANTIGÉNICOS EN EL VP₁ DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA

T.R. DOEL, M.M. KANASHIRO, J.L. da SILVA

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS)

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

RESUMEN. La mayoría de los anticuerpos monoclonales (AcMs) desarrollados contra las cepas O₁, Campos, A₂₄, Cruzeiro y C₃, Indaial de la fiebre aftosa y que previamente mostraron reacción con el VP₁ en "Western Blots", reconocieron péptidos sintéticos correspondientes a la secuencia 141-158 de esta proteína. Un número significativo de los AcMs que reconocieron péptidos sintéticos, lo hicieron de forma heteróloga u homóloga. Así, muchos de los AcMs A₂₄, Cruzeiro reconocieron un péptido O₁, Kaufbeuren y atribuyeron su reacción cruzada a la región 141-158 del VP₁. Un AcM C₃, Indaial reconoció péptidos correspondientes a tres serotipos y la actividad cruzada fue atribuida a la secuencia 200-213 del VP₁. Generalmente, la reacción cruzada de un AcM dado se observó con el virus y con el péptido, pero no con los dos antígenos.

Anticuerpos monoclonales (AcMs) desarrollados contra la fiebre aftosa han sido extensivamente usados en investigaciones aplicadas y fundamentales. Aplicaciones notables incluyen la definición de sitios antigénicos en el virus (10) y la diferenciación de cepas, particularmente con respecto al relacionamiento entre cepas de campo y cepas de vacuna. En estas últimas, generalmente se usan paneles de AcMs como soporte de los datos obtenidos con reaccionantes policlonales. Mientras que el valor de estos paneles en la discriminación entre virus estrechamente relacionados o en la detección de pequeñas variaciones antigénicas es indiscutible, la exacta relevancia de la información

obtenida para los aspectos prácticos en el diagnóstico y control de la infección no es tan clara.

Una razón para ésto es que los AcMs escogidos pueden no ser totalmente representativos de la reacción de los anticuerpos policlonales de una determinada especie, a la vacunación o a la infección con fiebre aftosa. En verdad, la combinación de consideraciones técnicas e inmunológicas fundamentales, tornan difícil que cualquier laboratorio pueda desarrollar una colección comprensible de AcMs. Vale considerar que la evidencia de por lo menos cinco sitios antigénicos del tipo O de la fiebre aftosa se obtuvo de cuatro laboratorios diferentes (3,11). Otra complicación es la tendencia a seleccionar AcMs y paneles de AcMs basados en su capacidad de neutralizar virus *in vitro*. Aunque no se pretende desvalorizar la neutralización en sí, existen AcMs y sueros policlonales con gran poder neutralizante *in vitro*, pero que son conside-

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

rablemente menos efectivos en pruebas de protección *in vivo* y vice-versa (15).

Resulta claro, entonces, que las colecciones de AcMs deben ser caracterizadas en forma comprensible, para asegurarse de que las interpretaciones que se hagan tengan sentido. Con este objetivo, en el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (PANAFTOSA) se ha mantenido un programa continuo para desarrollar y caracterizar completamente AcMs contra las cepas más importantes de América del Sur. Una publicación previa (1) describió el alcance de las propiedades de los AcMs desarrollados contra las cepas O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro y C₃ Indaial, incluyendo su capacidad para reconocer epítopes independientes de conformación, según deducido de las reacciones de proteínas de virus desnaturalizados, así como de virus completos, o epítopes independientes de conformación, según deducido de la reacción de virus individuales. En este estudio hemos ampliado el trabajo con estos y otros AcMs para examinar el reconocimiento de algunos péptidos sintéticos, especialmente con referencia a la identificación de secuencias unidas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Péptidos sintéticos. Estos fueron o bien gentilmente cedidos por el Dr. Richard DiMarchi (Eli Lilly Research Laboratories, Indianapolis, EE.UU.), o preparados por uno de los autores (T.R.Doel) en el Institute for Animal Health, UK y donados por el Dr. Mike Parkhouse. Los péptidos fueron sintetizados por los métodos de fase sólida T-boc.

Casi todo el análisis básico fue realizado con tres péptidos basados en las secuencias VP₁ de las cepas O₁ Kaufbeuren, A₂₄ Cruzeiro y C₃ Indaial de la fiebre aftosa (12). Cada péptido incorporó dos regiones antigénicas de la secuencia VP₁, y los péptidos O₁ Kaufbeuren y A₂₄ Cruzeiro contenían aminoácidos adicionales entre las dos secuencias y en cada extremo (7). O sea:

El péptido O₁ fue C-C-X_O-P-P-S-Z_O-P-C-G
El péptido A₂₄ fue C-C-X_A-P-P-S-Z_A-P-C-G

donde C,G,P y S son códigos de una letra para cisteína, glicina, prolina y serina y:

X_O es la secuencia 200-213 de la cepa O₁ K de la fiebre aftosa y es:

R-H-K-Q-K-I-V-A-P-V-K-Q-T-L

X_A es la secuencia equivalente de la cepa A₂₄ Cruzeiro de la fiebre aftosa y es:

R-H-K-Q-K-I-I-A-P-A-K-Q-L-L

Z_O es la secuencia 141-158 de la cepa O₁ K de la fiebre aftosa y es:

V-P-N-L-R-G-D-L-Q-V-L-A-Q-K-V-A-R-T

Z_A es la secuencia equivalente de la cepa A₂₄ Cruzeiro de la fiebre aftosa y es:

G-S-G-R-R-G-D-M-G-S-L-A-A-R-V-V-K-Q

El péptido C₃ tiene la construcción Z_C-X_C donde

Z_C es la secuencia 134-160 de la cepa C₃ Indaial de la fiebre aftosa y es:

T-G-T-T-A-Y-T-A-S-A-R-R-G-D-L-A-H-L-A-A-A-H-A-R-H-L-P

X_C es la secuencia 196-213 de la cepa C₃ Indaial de la fiebre aftosa y es:

P-A-G-D-R-H-K-Q-P-L-I-A-P-A-K-Q-L-L

Otros péptidos usados incluyeron las secuencias individuales 141-158 y 200-213 de los virus O₁ y A₂₄ y superposición de grupos de péptidos correspondientes a los péptidos C-C-X_O-P-P-S-Z_O-P-C-G y C-C-X_A-P-P-S-Z_A-P-C-G. Cada grupo se formó por el procedimiento de "tea-bags" (bolsistas de té) (9) y se compuso de 29 péptidos 12-mer, con cada péptido superpuesto al próximo en la secuencia por 11 aminoácidos.

Anticuerpos monoclonales. La mayoría de los AcMs usados en este estudio ya fueron descritos (1,17). El AcM OC3 (anti-O₁ Caseros) fue gentilmente cedido por la Dra. Sandra Farias, Universidad Federal, Porto Alegre, Brasil. El AcM B2 (anti-O₁ Suiza 1965) fue descrito originalmente por Crowther et al. (4).

Inmunoensayos. La prueba de ELISA se efectuó como descrita anteriormente (7), con pequeñas variaciones. Resumiendo, placas de plástico (Nunc Immunoplate 1*) se revistieron, a 4°C, con 3 µg/ml de péptidos sintéticos en 15 mM de tampón/bicarbonato, pH 9,6, por una noche. Al día siguiente, a las placas se adicionaron diluciones de AcMs y se incubaron a 37°C por 30 minutos. Después de una incubación con inmunoglobulina antirratón conjugada con peroxidasa de rabanito, se detectaron reacciones positivas con O-fenilenediamina/H₂O₂. La proteína portadora usada en el diluyente para el conjugado de enzimas y AcMs, fue ovalbúmina al 1% en PBS, conteniendo 0,05% v/v de Tween 20.

RESULTADOS

El cuadro 1 resume algunas de las propiedades de los AcMs en este estudio, incluyendo su capacidad para reconocer péptidos sintéticos correspondientes a dos secuencias del VP₁. Con respecto a esta última propiedad, en el cuadro 1 se distinguen claramente dos reacciones. Ninguno de los AcMs, caracterizados previamente como reconocedores de epítopes dependientes de conformación (1), reconoció los péptidos homólogos del VP₁ ni, cuando ensayados, ninguno de los péptidos heterólogos. La otra categoría de AcMs, caracterizada previamente como independiente de conformación por su reacción con el VP₁ en experimentos en "Western Blotting", reconoció los péptidos en forma consistente y, en particular, la región 141-158, como se dedujo con péptidos correspondientes a secuencias más cortas. Un número de AcMs, no caracterizado previamente sobre su reconocimiento de epítopes dependientes o independientes de conformación, se probaron a ciegas contra los péptidos. Aquellos que reconocieron uno de los péptidos, también se mostraron capaces de unirse a los homólogos del VP₁ en experimentos en "Western Blotting", mientras que

los que no reconocieron ningún péptido no se unieron a ninguna de las proteínas estructurales desnaturalizadas del virus (no se presentan los resultados). Así, la unión de péptidos representa un método fácil y rápido para iniciar la agrupación de un número mayor de AcMs.

Experimentando primero con el reconocimiento específico de serotipos, los AcMs O₁ 11HC10, 36AF8 y 36BE8 reaccionaron con "tea-bag" de péptidos 12-mer O₁ cubriendo el locus Arg-Gly-Asp (RGD) en la región 141-158 del VP₁. El perfil obtenido con el AcM 11HC10 se muestra en la figura 1 y difiere un poco de los del 36AF8 y del 36BE8 en términos del número de péptidos reconocidos alrededor de la secuencia RGD. Así, el 11HC10 reaccionó fuertemente con solo tres péptidos, mientras que el 36AF8 y el 36BE8 tuvieron reacciones más amplias, similares a las de los AcMs OC3 mostrados en la figura 1. Los perfiles para los AcMs B2 y OC3 se muestran por su importancia histórica en relación a la definición de los sitios antigénicos del virus O₁ que envuelven al VP₁ 140-160, específicamente los sitios 1 y 5, respectivamente (3). Todos los AcMs A₂₄ que reconocieron los péptidos A₂₄ grandes, indicados en el cuadro 1, con la posible excepción del 31FE7 que no fue probado, también reconocieron la secuencia 141-158-Pro-Cys-Gly del A₂₄. En general, la reacción de los AcMs A₂₄ con un grupo de "tea-bag" de péptidos A₂₄ fue baja, aunque el 31DF4 reconoció fuertemente un péptido dentro de la secuencia 141-158 (cuadro 1). El fracaso para definir con más precisión los aminoácidos reconocidos por los AcMs A₂₄ puede deberse a los tamaños/conformaciones relativos de los "tea-bags" de péptidos 12-mer y la secuencia 141-158-Pro-Cys-Gly. Muchos de los AcMs C₃ que fueron caracterizados como reconociendo un epítope continuo (VP₁ en el "Western Blotting"), reaccionaron fuertemente al péptido C₃ que contenía las regiones 140-158 y 200-213 del VP₁. Todos estos AcMs, excepto el 7JA1, reconocieron un péptido menor correspondiente a la secuencia 140-160 (resultados no mostrados y ref. 14).

Un rasgo importante de muchos de los AcMs fue la capacidad de reconocer uno o ambos péptidos

* La mención de firmas comerciales o de sus productos es solamente para identificación y no constituye endoso por los autores o sus organizaciones.

Cuadro 1. Resumen de las propiedades de los anticuerpos monoclonales (AcMs)

AcMs O ₁ CAMPOS								
AcMs	Tipo ^a	Sero ^b		Prueba ^c	Reacción con péptidos ^d			Secuencia
		Neut	Prot		O ₁	C ₃	A ₂₄	
12BB5	CON	<1.2	3.25	N	0	-	-	
36AC6	CON	>3.6	2.5	N	0	-	-	
12FA5	CON	<1.2	0.88	N	0	-	-	
12DB7	CON	1.9	2.83	N	0	-	-	
13EG1	CON	<1.2	0	N	0	-	-	
11HC10	VP ₁	<3.5	4.27	Y	++++	0	0	PPSVPNLRGDLQ
11AD6	CON	<1.2	2.35	N	0	-	-	
12GG11	CON	<1.2	0	N	0	-	-	
36AF8	VP	-	-	-	++++	++	?	PPSVPNLRGDLQ
36BE8	VP ₁	-	-	-	++++	?	?	PPSVPNLRGDLQ
AcMs A ₂₄ CRUZEIRO								
31EF12	CON	1.8	4.25	Y	-	-	0	
32DH3	CON	<1.2	4.25	Y	-	-	0	
31DF4	VP ₁	3.4	4.03	Y	++++	0	++++	LPPSGSGRRGDM
32AA5	VP ₁	<1.2	0.85	Y	++++	0	++++	
31FA4	VP ₁	<1.2	3.15	Y	++++	?	++++	
16EC11	VP ₁	<1.2	3.0	Y	0	0	++++	
31GA6	CON	<1.2	3.85	Y	0	0	0	
31GA3	VP ₁	<1.2	3.35	-	0	0	++++	
31DB8	VP ₁	<1.2	4.02	-	++++	0	++++	
31DC7	VP ₁	<1.2	2.24	-	+++	0	++++	
31DE3	VP ₁	<1.2	3.0	-	+++	0	++	
31EH2	CON	1.5	2.75	-	0	0	0	
31FE7	VP ₁	<1.2	3.1	-	++++	0	++++	
31CG4	VP ₁	<1.2	1.25	-	+++	0	++	
31ED1	CON	1.4	4.5	-	0	0	0	
31EA12	CON	1.3	2.0	-	0	0	0	
AcMs C ₃ INDAIAL								
7FC12	VP ₁	3.3	3.0	Y	0	++++	0	
7LA5	CON	<1.2	4.25	N	-	0	-	
7CA8	VP ₁	>3.6	3.25	Y	0	+++	0	
7CH1	CON	1.9	3.75	Y	-	0	-	
7AB5	VP ₁	3.5	> 4.75	Y	0	++	0	
7DF10	CON	1.5	4.32	N	-	0	-	
1BH8	VP ₁	1.9	2.22	Y	0	+++	?	
2LC9	VP ₁	<1.2	1.7	Y	0	++++	0	
7EE6	VP ₁	3.4	3.07	Y/N	0	+++	0	
7AH1	VP ₁	<1.2	0.6	-	0	++++	0	
7CA11	VP ₁	3.5	3.6	Y/N	0	++++	0	
7JA1	VP ₁	<0.61	0.46	-	++++	++++	++++	KIVAPVKQLPP
7JD1	VP ₁	>3.61	3.5	-	0	++++	?	

Adaptado de la Ref. 1.

^a Tipo. Indica el tipo de antígeno con el cual el AcM reacciona. Todos los AcMs fueron seleccionados inicialmente por el reconocimiento del virus en ELISA, pero fueron discriminados subsecuentemente sobre su reacción (VP₁) o no reacción (CON) con la proteína VP₁ en "Western Blotting".

^b Título del AcM en pruebas de seroneutralización en cultivos de tejidos (Neut) e seroprotección en ratones (Prot).

^c Reacción de AcM con virus tratado con tripsina. Y indica que la unión del anticuerpo al virus tratado con tripsina es anulada.

^d El péptido de O₁ fue C-C-X₂-P-P-S-Z₀-P-C-G, el péptido de A₂₄ fue C-C-X₁-P-P-S-Z₄-P-C-G y el péptido de C₃ tenía la construcción de Z_c-X_c. Se dan las secuencias reconocidas con péptidos de "tea-bags" y corresponden al péptido que dio el pico del valor de absorbancia. Para más informaciones ver Materiales y Métodos. La reacción obtenida en una escala de 0 (sin unión del AcM al péptido) a ++++ unión fuerte.

- experimento no realizado.

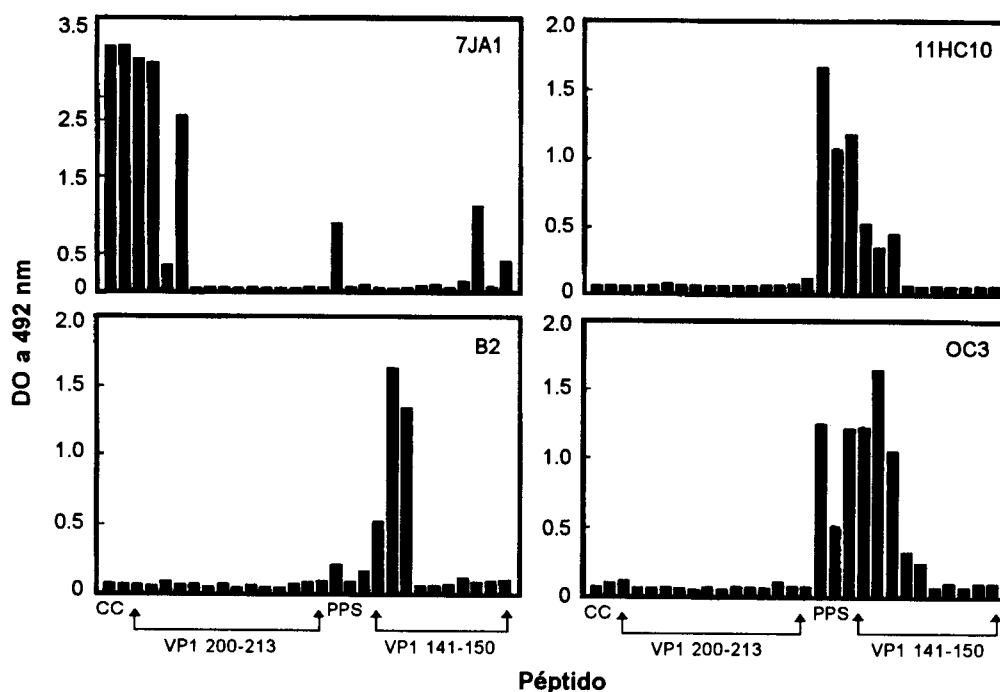


Figura 1. ELISA y cuatro AcMs contra "tea-bags" de péptidos. Cada panel muestra 29 péptidos 12-mer, basados en péptidos C-C-X_A-P-P-S-Z_A-P-C-G ó C-C-X_O-P-P-S-Z_O-P-C-G (ver Materiales y Métodos). El 12-mer en el extremo izquierdo del panel es C-C-(200-209), a la derecha del cual están los péptidos C-(200-210), (200-211), (201-212), (202-213), (203-214)-P etc. Por tanto, el péptido en el extremo derecho es (150-158)-P-C-G. Los AcMs 11HC10, B2 and OC3 fueron ensayados contra el péptido O₁ Kaufbeuren, mientras que el AcM 7JA1 fue ensayado contra el péptido A₂₄ Cruzeiro.

heterólogos descritos en el cuadro 1. Por ejemplo, el AcM O₁, 36AF8 reconoció tanto el péptido C₃ Indaial como el péptido homólogo. Según los datos de "tea-bags" de péptidos con estos AcMs, resulta sugestivo que la reacción cruzada ocurre dentro de la región 141-158 del VP₁. El mismo AcM también tuvo reacción cruzada con los virus heterólogos en la prueba de ELISA, pero en un grado mucho menos significativo que en la reacción homóloga (resultados no mostrados). Con excepción del 16EC11 y del 31GA3, todos los AcMs A₂₄ independientes de conformación reconocieron el péptido serotipo O₁ en extensión igual o similar a la secuencia homóloga. Basados en la fuerte reacción de los AcMs A₂₄ con la secuencia A₂₄ 141-158-Pro-Cys-Gly y en la débil, pero significativa reacción de la mayoría de los AcMs A₂₄ con el péptido O₁,

equivalente, esta reacción cruzada se atribuyó al sitio o sitios dentro de esta secuencia. Es interesante notar que todos los AcMs A₂₄ independientes de conformación reconocieron fuertemente un péptido O₁ con la estructura general (141-158) (141-158)-Pro-Cys-Gly, o sea, la forma dimérica de la secuencia 141-158 del O₁, sugiriendo la importancia del tamaño del péptido o consideraciones esteéricas en los resultados de la prueba de ELISA. Por razones que por el momento no son claras, la única reacción observada cuando los AcMs de reacción cruzada A₂₄ se probaron contra el grupo de "tea-bags" de péptidos O₁, fue una reacción baja pero significativa con los péptidos 12-mer al extremo C de la secuencia 141-158-Pro-Cys-Gly, específicamente QVLAQKVARTPC y el AcM 31DC7, o sea, una reacción diferente a la observada con el

31DF4 y el grupo de homólogos en "tea-bag". El nivel de reacción cruzada observada con los AcMs A_{24} y con los péptidos O_1 y A_{24} no se reflejó en las pruebas de ELISA con los diferentes virus, en las que poca o ninguna reacción fue observada. Solamente uno de los AcMs C_3 reaccionó con más de un péptido. La figura 2 muestra que el 7JA1 reconoció cada uno de los tres péptidos con igual intensidad, pero fue relativamente específico en sus reacciones con el virus C_3 . En contraposición, otro AcM C_3 , el 7EE6, reconoció solo el péptido C_3 , pero su reacción cruzada fue considerablemente mayor con los tres virus en la prueba de ELISA (figura 2). Manteniendo esta especificidad con el péptido, el 7EE6 solo neutralizó los virus homólogos C_3 en pruebas de seroneutralización de

suero. El AcM 7JA1 también reconoció los grupos de "tea-bags" de O_1 y A_{24} en la región 200-213 del péptido (figura 1) y es el único ejemplo claro, en este trabajo, de reacción en este sitio. En la prueba de ELISA (figura 1), el 7JA1 también mostró reacción con varios péptidos en la secuencia Pro-Ser-141-158-Pro-Cys-Gly, aunque la fuerza con estos péptidos fue considerablemente más débil que con las secuencias 200-213. En este último, los valores de DO fueron arriba de 2.

DISCUSIÓN

La complejidad antigénica del virus de la fiebre aftosa se ha demostrado en diversos estudios utilizando AcMs (2,3,10,11,14,16). Mateu et al.

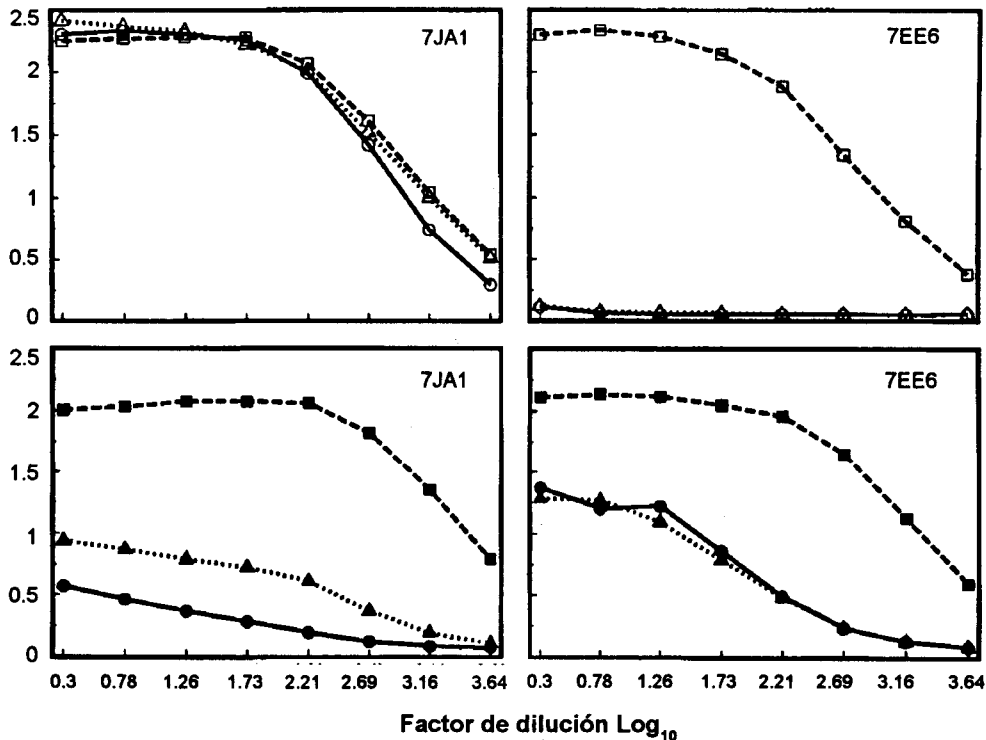


Figura 2. ELISA y dos AcMs C_3 Indaial (7JA1 y 7EE6) contra tres péptidos sintéticos y tres virus. Cuadrados abiertos y cerrados son el péptido Z_c-X_c del C_3 Indaial y el virus respectivamente. Triángulos abiertos y cerrados son el péptido $C-C-X_A-P-P-S-Z_A-P-C-G$ del A_{24} y el virus respectivamente. Círculos abiertos y cerrados son el péptido $C-C-X_O-P-P-S-Z_O-P-C-G$ del virus O_1 Kaufbeuren y del virus O_1 Campos respectivamente. Para las secuencias completas de péptidos ver Materiales y Métodos.

(14) estudiaron 31 AcMs sudamericanos aislados y 15 europeos aislados del serotipo C contra un gran espectro de los AcMs antiviral C, que incluyeron muchos de los indicados en el cuadro 1. Estos sugieren la existencia de, por lo menos, 12 epítopes involucrados en la neutralización de virus de este serotipo. Recientemente, relataron que 23 de los 36 AcMs probados reconocieron el VP₁ y distinguieron por lo menos 13 epítopes del virión independientes de conformación, implicados en la neutralización del virus tipo C de la fiebre aftosa (13). Más aún, por lo menos 10 epítopes sobrepuestos distinguibles se atribuyeron a residuos 138-150 del VP₁. Kitson et al. (10) secuenciaron virus O₁ de la fiebre aftosa resistentes a AcMs neutralizantes individuales o múltiples, basado en que éstos propusieron cuatro sitios principales para este serotipo. El sitio 1 fue asociado con aminoácidos en la secuencia 140-160 del VP₁ y su extremo C (residuo 208) y se consideró como un epítope esencialmente independiente de conformación, mientras que los otros tres sitios se consideraron sitios naturalmente conformacionales. El sitio 2 involucró los residuos 70-77 y 131 del VP₂; el sitio 3, los residuos 43-48 del VP₁, y el sitio 4, el residuo 58 del VP₃. Utilizando el AcM OC3 y un mutante resistente al OC3, Crowther et al. (3) propusieron recientemente un quinto sitio independiente de conformación. Sin embargo, el reconocimiento de la región 141-158 del VP₁ por el AcM OC3 (este trabajo) y los cambios en los aminoácidos observados en esta secuencia en el mutante resistente al OC3 (3), indican una asociación próxima entre los sitios 1 y 5 del serotipo O₁. Kitson et al. (10) también actualizaron la literatura de los sitios antigénicos del serotipo A. El sitio 1 consistía de residuos 140-160 del VP₁, así como implicaba varios aminoácidos en el extremo C del VP₁. Los residuos 175 y 178 del VP₃ también fueron implicados para el virus A₁₂. El sitio 2 involucraba residuos solo dentro del VP₂; el sitio 3, aminoácidos alrededor de la posición 170 del VP₁, y el sitio 4 implicaba los residuos 58-61, 69-70, 136-139 y 195 del VP₃. La variabilidad en la cantidad de sitios antigénicos definidos por serotipo se debe a varios factores. Por ejemplo, algunos autores han informado sitios

múltiples para una secuencia dada (13), considerada por otros como un sitio individual. También, el número de sitios informados para una cepa de virus dada puede reflejar la intensidad de las investigaciones y el número de AcMs disponibles.

Una cuestión clave en estos estudios es la importancia de los sitios identificados para la protección del hospedero. Ciertamente, por muchos años el sitio 1 ha sido considerado importante, con base en observaciones como la considerable disminución en la inmunogenicidad de las vacunas después del tratamiento del virus con tripsina (5) y su capacidad de proteger animales con péptidos sintéticos representando este sitio (7). Con el serotipo O, también existe evidencia persuasiva de Crowther et al. (3), sugiriendo la importancia de todos los 4/5 sitios antigénicos de este serotipo. Su trabajo demostró que el reconocimiento por el suero de ganado vacunado o postinfectado contra cepas emparentadas solo fue negado por un virus mutante escapado de un AcM en que todos los 4/5 sitios antigénicos habían cambiado. Existe evidencia de aislados de campo que sitios diferentes del sitio 1 pueden ser importantes en la protección. Feigelstock et al. (8) atribuyeron el fracaso de la cepa vacunal C₃ Resende Br/55 para proteger el ganado contra el aislado de campo C₃ Argentina/84, a cambios en la secuencia en tres sitios antigénicos diferentes del VP₁ 135-160 y 200-213.

En este trabajo, un número considerable de AcMs, principalmente entre aquellos contra los virus A₂₄ y C₃, reconocieron el VP₁ 141-158. Esto tiene implicaciones para los grupos de AcMs usados para analizar virus sometidos a PANAFTOSA (1). Por ejemplo, de los ocho AcMs A₂₄ y uno C₃ normalmente usados para examinar virus serotipos A, cinco reconocieron el VP₁ 141-158. De los nueve AcMs C₃ normalmente usados, cinco reconocieron el VP₁ 141-158. Esto no quiere decir que cada uno de los cinco AcMs dentro de un grupo reconozca exactamente el mismo epítope. En realidad, los datos de Mateu et al. (13) demostraron por lo menos 10 epítopes distinguibles dentro del VP₁ 138-150 y los únicos padrones observados por Alonso et al. (1), cuando examinaron las reacciones de los AcMs contra un número grande de virus, sugieren que los AcMs estaban reconociendo

epítopes distinguibles. Así, la presente observación enfatiza la necesidad de caracterizar completamente las colecciones de AcMs en general y, específicamente, los AcMs mantenidos en PANAFOSA, a fin de agruparlos en el contexto de sitios antigénicos de importancia (relevantes). Esto debe incluir los AcMs que neutralizan débilmente o que no neutralizan en absoluto, dado el hecho de que la neutralización *in vitro* no es necesariamente correlacionada con la protección *in vivo* (cuadro 1; ref. 15). Sin embargo, Mateu et al. (14) hicieron la interesante observación de que todos los AcMs del serotipo C no neutralizantes en su trabajo, reaccionaron igual con todos los virus C aislados, sudamericanos y europeos, probados. De esto dedujeron que los epítopes reconocidos por estos AcMs eran altamente conservados y, por lo tanto, inadecuados para tener, serológicamente, alguna importancia. Los esfuerzos se dirigen ahora a la producción de AcMs resistentes a mutaciones que permitan la agrupación de los AcMs y, con secuencias seleccionadas, la identificación de los sitios antigénicos implicados.

Muchos de los AcMs reconocieron más de un serotipo al nivel del péptido, mientras que el reconocimiento de virus fue, invariablemente, de un serotipo específico. Esto fue notable con los AcMs A₂₄, ocho de los cuales reconocieron los péptidos O₁ y A₂₄, mientras que dos fueron serotipo específico en el sentido péptido. La reacción cruzada observada en los dos serotipos, O y A, fue atribuida a la región 141-158 del VP₁, en contraste con la alta actividad cruzada del AcM C₃ 7JA1, que reconoció claramente los péptidos en la región 200-213 (este trabajo; ref. 13). Existen varios aspectos sobre reacción cruzada que merecen más comentarios. A pesar de la ausencia de actividad cruzada y/o protección cruzada entre serotipos después de una infección o vacunación múltiple con virus completos, resulta claro que los anticuerpos con reacción cruzada pueden ser estimulados bajo algunas circunstancias. Por ejemplo, el AcM neutralizante 7EE6 reconoce un determinante común a los tres serotipos, si bien que con extensiones diferentes. Además, el 7JA1 reconoce la región 200-213 del VP₁ de, por lo menos, tres serotipos que, en la forma de péptido sintético Cys-

(200-213)-Pro-Pro-Ser-(141-158)-Pro-Cys-Gly, estimula anticuerpos antipéptidos con reacción cruzada y protección cruzada en la infección de un cobayo (6, 7). También es interesante notar que los sitios de reacción cruzada fueron identificados en la región 141-158 del VP₁ por algunos de los AcMs A₂₄ y O₁ de este estudio. La cuestión más intrigante es si será posible diseñar nuevas vacunas que permitan la presentación de partículas de virus convencionales o, más probablemente, antígenos sintéticos o recombinantes, para el sistema inmunológico del hospedero, de manera que estimule, de preferencia, la población de los anticuerpos deseados.

REFERENCIAS

1. ALONSO, A., GOMES, M.P.D., RAMALHO, A.K., ALLENDE, R., BARAHONA, H., SÖNDAHL, M.S., OSORIO, F.A. Characterization of foot-and-mouth disease virus by monoclonal antibodies. *Viral Immunol.*, 6 (3): 219-228, 1993.
2. BARNETT, P.V., OULDRIDGE, E.J., ROWLANDS, D.J., BROWN, F., PARRY, N. Neutralizing epitopes of type O foot-and-mouth disease virus. I. Identification and characterization of three functionally independent, conformational sites. *J. Gen. Virol.*, 70: 1483-1491, 1990.
3. CROWTHER, J.R., FARIAS, S., CARPENTER, W.C., SAMUEL, A.R. Identification of a fifth neutralizable site on type O foot-and-mouth disease virus following characterization of single and quintuple monoclonal antibody escape mutants. *J. Gen. Virol.*, 74: 1547-1554, 1993.
4. CROWTHER, J.R., McCULLOUGH, K.C., DE SIMONE, F., BROCCCHI, E. Monoclonal antibodies against FMDV: applications and potential use. In: *FAO. Report of a Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease*. Brescia, Italy, 26-28 June 1984.
5. DOEL, T.R., COLLEN, T. Qualitative assessment of 146S particles of FMDV in preparations destined for vaccines. *J. Biol. Standard.*, 10: 69-81, 1982.
6. DOEL, T.R., DOEL, C.M.F.A., STAPLE, R.F., DIMARCHI, R. Cross-reactive and serotype specific antibodies against foot-and-mouth disease

- virus generated by different regions of the same synthetic peptide. *J. Virol.*, 66: 2187-2194, 1992.
7. DOEL, T.R., GALE, C., do AMARAL, C.M.C.F., BROOKE, G., MULCAHY, G., DIMARCHI, R. Heterotypic protection induced by synthetic peptides corresponding to three serotypes of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.*, 64: 2260-2264, 1990.
 8. FEIGELSTOCK, D., MATEU, M.G., PICCONE, M.E., DE SIMONE, F., BROCCCHI, E., DOMINGO, E., PALMA, E.L. Extensive antigenic diversification of foot-and-mouth disease virus by amino acid substitutions outside the major antigenic site. *J. Gen. Virol.*, 73: 3307-3311, 1992.
 9. HOUGHTEN, R.A. General method for the rapid solid phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interactions at the level of individual amino acids. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 82: 5131-5135, 1985.
 10. KITSON, J.D.A., McCAHON, D., BELSHAM, G.J. 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: 26-34, 1990.
 11. McCAHON, D., CROWTHER, J.R., BELSHAM, G.J., KITSON, J.D.A., DUCHESNE, M., HAVE, P., MELOEN, R.H., MORGAN, D.O., DE SIMONE, F. Evidence for at least four antigenic sites on type O foot-and-mouth disease virus involved in neutralisation: identification by single and multiple site monoclonal antibody resistant mutants. *J. Gen. Virol.*, 70: 639-645, 1989.
 12. MAKOFF, A.J., PAYNTER, 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 Acid Res.*, 10: 8285-8295, 1982.
 13. MATEU, M.G., MARTINEZ, M.A., CAPUCCI, L., ANDREU, D., GIRALT, E., SOBRINO, F., BROCCCHI, E., DOMINGO, E. 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: 629-637, 1990.
 14. MATEU, M.G., SILVA, J.L., ROCHA, E., BRUM, D.L., ALONSO, A., ENJUANES, L., DOMINGO, E., BARAHONA, H. Extensive antigenic heterogeneity of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *Virology*, 167: 113-124, 1988.
 15. MULCAHY, G., PULLEN, L.A., GALE, C., DIMARCHI, R.D., DOEL, T.R. Mouse protection test as a predictor of the protective capacity of synthetic foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine*, 9: 19-24, 1991.
 16. 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.
 17. SILVA, J.L., KANASHIRO, M.M., BRUM, D.L. Producción y caracterización de anticuerpos monoclonales contra la fiebre aftosa. Production and characterization of monoclonal antibodies against foot-and-mouth disease virus. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 59: 77-92, 1993.

Anuncio

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

Seminarios - Cursos - Adiestramientos en Servicio

Área 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

Área de Epidemiología, Infraestructura y Servicios:

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

DETAILED CHARACTERIZATION OF SOME MONOCLONAL ANTIBODIES WHICH RECOGNIZE ANTIGENIC SITES ON VP₁ OF FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS

T.R. DOEL, M.M. KANASHIRO, J.L. da SILVA

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

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

SUMMARY. Most monoclonal antibodies (MAbs) raised against the O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro and C₃ Indaial strains of foot-and-mouth disease virus (FMDV), and which were previously shown to react with VP₁ in Western Blots, recognized synthetic peptides corresponding to the 141-158 sequence of this protein. A significant number of the MAbs which recognized synthetic peptides did so in a heterologous as well as homologous manner. Thus, many of the A₂₄ Cruzeiro MAbs recognized an O₁ Kaufbeuren peptide and the cross-reactivity was ascribed to the 141-158 region of the VP₁. One C₃ Indaial MAb recognized peptides corresponding to three serotypes and the cross-reactivity was ascribed to the 200-213 sequence of the VP₁. Usually, the cross-reactivity of a given MAb was observed with either the virus or the peptide but not with both antigens.

Monoclonal antibodies (MAbs) raised against foot-and-mouth disease virus (FMDV) have been widely used in fundamental and applied investigations. Notable applications include the definition of antigenic sites on the virus (10) and strain differentiation with particular respect to the relationship among field strains and to vaccine strains. Usually, panels of MAbs are used in the latter application to support data obtained with polyclonal reagents. While the value of these panels in discriminating between closely related viruses or detecting slight antigenic changes is indisputable, the precise relevance of the information obtained to practical aspects in the diagnosis and control of the disease may be more obscure.

One reason for this is that the MAbs chosen may not be fully representative of the polyclonal antibody response of a target species to vaccination or infection with FMDV. Indeed, a combination of fundamental immunological and technical considerations make it unlikely that any one laboratory would be successful in developing a comprehensive library of MAbs. It is worth reflecting that the evidence for at least five antigenic sites in type O FMDV was obtained with MAbs from four different laboratories (3,11). A further complication is the tendency to select MAbs and MAb panels on the basis of their ability to neutralize virus *in vitro*. While it is not intended to devalue neutralization *per se*, both MAbs and polyclonal sera do exist which neutralize strongly *in vitro* but are considerably less effective in *in vivo* protection tests and vice-versa (15).

It is clear, therefore, that MAb libraries should be characterized comprehensively to en-

Reprint requests to:

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

sure that any interpretations made are meaningful. To this end, there has been a continuous programme within the Pan American Foot-and-Mouth Disease Center (PANAFTOSA) to develop and characterize fully MAbs against strains of major importance to South America. A previous publication (1) described a range of properties of MAbs raised against the O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro and C₃ Indaial strains of FMDV including their ability to recognize conformation-independent epitopes, as deduced from reactivities with denatured virus proteins as well as whole virus, or conformation-dependent epitopes, as deduced from reactivity with virus alone. In the present study, we have extended the work with these and other MAbs to examine the recognition of some synthetic peptides with particular reference to identifying the binding sequences.

MATERIAL AND METHODS

Synthetic Peptides. These were either a kind gift from Dr. Richard DiMarchi (Eli Lilly Research Laboratories, Indianapolis, U.S.A.) or prepared by one of the authors (T.R. Doel) at the Institute for Animal Health, Pirbright, U.K. and donated by Dr. Mike Parkhouse. Peptides were synthesized by T-boc solid phase methods.

Most of the basic screening was done with three peptides based on the VP₁ sequences of the O₁ Kaufbeuren, A₂₄ Cruzeiro and C₃ Indaial strains of FMDV (12). Each peptide incorporated two antigenic regions of the VP₁ sequence and, in the case of the O₁ Kaufbeuren and A₂₄ Cruzeiro peptides, contained additional amino acids between the two sequences and at each end (7). That is:

O₁ peptide was C-C-X_O-P-P-S-Z_O-P-C-G
 A₂₄ peptide was C-C-X_A-P-P-S-Z_A-P-C-G

where C, G, P and S are the single letter codes for cysteine, glycine, proline and serine and:

X_O is the 200-213 sequence of the O₁ K strain of FMDV and is:

R-H-K-Q-K-I-V-A-P-V-K-Q-T-L

X_A is the equivalent sequence of the A₂₄ Cruzeiro strain of FMDV and is:

R-H-K-Q-K-I-I-A-P-A-K-Q-L-L

Z_O is the 141-158 sequence of the O₁ K strain of FMDV and is:

V-P-N-L-R-G-D-L-Q-V-L-A-Q-K-V-A-R-T

Z_A is the equivalent sequence of the A₂₄ Cruzeiro strain of FMDV and is:

G-S-G-R-R-G-D-M-G-S-L-A-A-R-V-V-K-Q

The C₃ peptide had the construction Z_C-X_C where

Z_C is the 134-160 sequence of the C₃ Indaial strain of FMDV and is:

T-G-T-T-A-Y-T-A-S-A-R-R-G-D-L-A-H-L-A-A-A-H-A-R-H-L-P

X_C is the 196-213 sequence of the C₃ Indaial strain of FMDV and is:

P-A-G-D-R-H-K-Q-P-L-I-A-P-A-K-Q-L-L

Other peptides used included the individual 141-158 and 200-213 sequences of the O₁ and A₂₄ viruses and overlapping peptide sets corresponding to the peptides C-C-X_O-P-P-S-Z_O-P-C-G and C-C-X_A-P-P-S-Z_A-P-C-G. Each set was made by the tea-bag procedure (9) and was composed of 29, 12-mer peptides with each peptide overlapping the next peptide in the sequence by 11 amino acids.

Monoclonal Antibodies. Most of the MAbs used in the present study have been described elsewhere (1, 17). McA OC3 (anti-O₁ Caseros) was kindly provided by Dr. Sandra Farias, Federal University, Porto Alegre, Brazil. MAb B2 (anti-O₁ Switzerland 1965) was originally described by Crowther et al. (4).

Immunoassays. ELISA was carried out as described previously (7) with a few minor variations. Briefly, plastic plates (Nunc Immunoplate 1*) were coated overnight at 4°C with 3 µg/ml synthetic peptides in 15 mM carbonate/bicarbonate buffer, pH 9.6. The following day, dilutions of MAbs were added to the plate and incubated at 37°C for 30 minutes. Following incubation with goat anti-mouse immunoglobulin conjugated to horseradish peroxidase, positive reactions were detected with O-phenylenediamine/H₂O₂. The carrier protein used in the diluent for the MAbs and enzyme conjugate was 1% ovalbumin in PBS containing 0.05% v/v Tween 20.

RESULTS

Table 1 summarizes some of the properties of the MAbs in the present study, including their ability to recognize synthetic peptides corresponding to two sequences within VP₁. With respect to the latter property, two reactivities are clearly distinguishable from table 1. None of the MAbs, which were previously categorized as recognizing conformation-dependent epitopes (1), recognized the homologous VP₁ peptides nor, when tested, any of the heterologous peptides. The other category of MAbs, previously characterized as conformation-independent because of reactivity with VP₁ in Western Blotting experiments, consistently recognized the peptides and, in particular, the 141-158 region as deduced with peptides corresponding to shorter sequences. A number of MAbs, not previously categorized with respect to recognizing conformation-dependent or -independent epitopes were tested blind against the peptides. Those which recognized one of the peptides were also found to bind to the homologous VP₁ in Western Blotting experiments, whereas those which did not recognize any of the peptides did not bind any of the

denatured structural proteins of the virus (results not shown). Thus, peptide binding represents a rapid and easy method to make an initial grouping of a large number of MAbs.

Dealing first with the serotype specific recognition, the O₁ MAbs, 11HC10, 36AF8 and 36BE8 reacted with O₁ 12-mer tea-bag peptides covering the Arg-Gly-Asp (RGD) motif in the 141-158 region of VP₁. The profile obtained with the 11HC10 MAb is shown in figure 1 and differed slightly from those of 36AF8 and 36BE8 in terms of the number of peptides recognized around the RGD sequence. Thus, 11HC10 reacted strongly with only three peptides whereas 36AF8 and 36BE8 had broader reactivities similar to that of the MAb OC3 shown in figure 1. The profiles for MAbs B2 and OC3 are given because of their historical importance in relation to defining those antigenic sites of O₁ virus which involve VP₁ 140-160, namely site 1 and site 5 respectively (3). All of the A₂₄ MAbs which recognized the large A₂₄ peptide indicated in table 1, with the possible exception of 31FE7 which was not tested, also recognized the A₂₄ 141-158-Pro-Cys-Gly sequence. In general, the reactivity of the A₂₄ MAbs with the A₂₄ tea-bag set of peptides was low, although 31DF4 recognized strongly one peptide within the A₂₄ 141-158 sequence (table 1). The failure to define more precisely the amino acids recognized by the A₂₄ MAbs may be due to the relative sizes/conformations of the tea-bag 12mers and the 141-158-Pro-Cys-Gly sequence. Many of the C₃ MAbs which were categorized as recognizing a continuous epitope (VP₁ in Western Blotting) bound strongly to the C₃ peptide which contained both the 140-158 and 200-213 regions of the VP₁. With the exception of 7JA1, all of these MAbs also recognized a smaller peptide corresponding to the 140-160 sequence (results not shown, and ref. 14).

A significant feature of many of the MAbs was the ability to recognize one or both of the heterologous peptides described in table 1. For example, the O₁ MAb, 36AF8, recognized both the C₃ Indiana peptide and the homologous peptide. Given the tea-bag data with this MAb, it is suggested that the cross-reactivity occurs within the

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

Table 1. Summary of properties of monoclonals

O ₁ CAMPOS MAb								
AcMs	Type ^a	Serum ^b		Try ^c	Reactivity with peptides ^d			Sequence
		Neut	Prot		O ₁	C ₃	A ₂₄	
12BB5	CON	<1.2	3.25	N	0	-	-	
36AC6	CON	>3.6	2.5	N	0	-	-	
12FA5	CON	<1.2	0.88	N	0	-	-	
12DB7	CON	1.9	2.83	N	0	-	-	
13EG1	CON	<1.2	0	N	0	-	-	
11HC10	VP ₁	<3.5	4.27	Y	++++	0	0	PPSVPNLRGDLQ
11AD6	CON	<1.2	2.35	N	0	-	-	
12GG11	CON	<1.2	0	N	0	-	-	
36AF8	VP ₁	-	-	-	++++	++	?	PPSVPNLRGDLQ
36BE8	VP ₁	-	-	-	++++	?	?	PPSVPNLRGDLQ
A ₂₄ CRUZEIRO MAb								
31EF12	CON	1.8	4.25	Y	-	-	0	
32DH3	CON	<1.2	4.25	Y	-	-	0	
31DF4	VP ₁	3.4	4.03	Y	++++	0	++++	LPPSGSGRRGDM
32AA5	VP ₁	<1.2	0.85	Y	++++	0	++++	
31FA4	VP ₁	<1.2	3.15	Y	++++	?	++++	
16EC11	VP ₁	<1.2	3.0	Y	0	0	++++	
31GA6	CON	<1.2	3.85	Y	0	0	0	
31GA3	VP ₁	<1.2	3.35	-	0	0	++++	
31DB8	VP ₁	<1.2	4.02	-	++++	0	++++	
31DC7	VP ₁	<1.2	2.24	-	+++	0	++++	
31DE3	VP ₁	<1.2	3.0	-	+++	0	++	
31EH2	CON	1.5	2.75	-	0	0	0	
31FE7	VP ₁	<1.2	3.1	-	++++	0	++++	
31CG4	VP ₁	<1.2	1.25	-	+++	0	++	
31ED1	CON	1.4	4.5	-	0	0	0	
31EA12	CON	1.3	2.0	-	0	0	0	
C ₃ INDAIAL MAb								
7FC12	VP ₁	3.3	3.0	Y	0	++++	0	
7LA5	CON	<1.2	4.25	N	-	0	-	
7CA8	VP ₁	>3.6	3.25	Y	0	+++	0	
7CH1	CON	1.9	3.75	Y	-	0	-	
7AB5	VP ₁	3.5	> 4.75	Y	0	++	0	
7DF10	CON	1.5	4.32	N	-	0	-	
1BH8	VP ₁	1.9	2.22	Y	0	+++	?	
2LC9	VP ₁	<1.2	1.7	Y	0	++++	0	
7EE6	VP ₁	3.4	3.07	Y/N	0	+++	0	
7AH1	VP ₁	<1.2	0.6	-	0	++++	0	
7CA11	VP ₁	3.5	3.6	Y/N	0	++++	0	
7JA1	VP ₁	<0.61	0.46	-	++++	++++	++++	KIVAPVKQTLPP
7JD1	VP ₁	>3.61	3.5	-	0	++++	?	

Adapted from Ref. 1.

^a Type. Indicates type of antigen with which MAb reacts. All MAb were initially selected on basis of recognition of virus in ELISA but were discriminated subsequently on their reactivity (VP₁) or non-reactivity (CON) with VP₁ protein in Western Blotting.

^b Titre of MAb in either tissue culture serum neutralization test (Neut) or protection test in mice (Prot)

^c Reactivity of MAb with trypsin-treated virus. Y indicates that binding of antibody to trypsin treated virus is abrogated.

^d O₁ peptide was C-C-X₁-P-P-S-Z₁-P-C-G, A₂₄ peptide was C-C-X₁-P-P-S-Z₁-P-C-G and the C₃ peptide had the construction Z₁-X₁. Sequences recognized with tea-bag peptides are given and correspond to the peptide which gave the peak absorbance value. See Materials and Methods for more information. Reactivity was assessed on a scale from 0 (no binding of MAb to peptide) to + + + + (strong binding);

- indicates experiment not done.

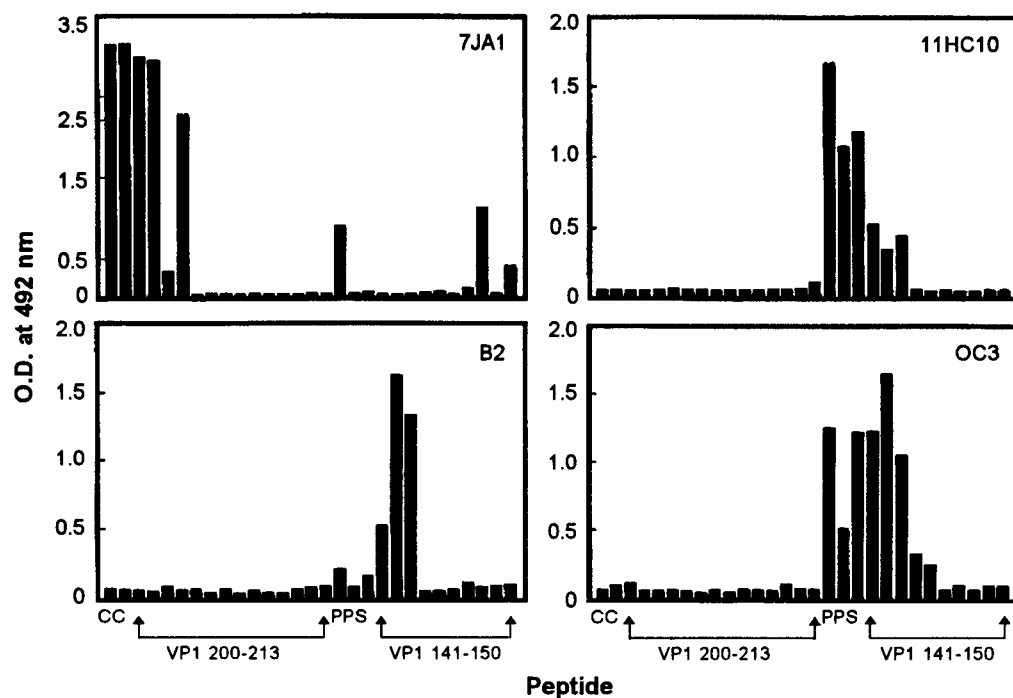


Figure 1. ELISA of four MAb against tea-bag peptides. Each panel shows 29, 12-mer peptides based on peptides C-C-X_A-P-P-S-Z_A-P-C-G or C-C-X_O-P-P-S-Z_O-P-C-G (See Materials and Methods). The 12-mer on the extreme left of each panel is C-C-(200-209), to the right of which are peptides C-(200-210), (200-211), (201-212), (202-213), (203-214)-P etc. Thus, the peptide on the extreme right is (150-158)-P-C-G. MAbs 11HC10, B2 and OC3 were assayed against the O₁ Kaufbeuren peptide set whereas MAb 7JA1 was assayed against the A₂₄ Cruzeiro peptide set.

141-158 region of the VP₁. The same MAb also cross-reacted in ELISA with the heterologous viruses but to a significantly lesser extent than the homologous reaction (results not shown). With the exception of 16EC11 and 31GA3 all of the conformation-independent A₂₄ MAbs recognized the O₁ serotype peptide to the same or a similar extent as the homologous sequence. On the basis of the strong reactivities of the A₂₄ MAbs with the A₂₄ 141-158-Pro-Cys-Gly sequence and the weak but significant reactivities of most A₂₄ MAbs with the equivalent O₁ peptide, this cross-reactivity was attributed to a site or sites within this sequence. Interestingly, all of the conformation-independent A₂₄ MAbs recognized very strongly an O₁ peptide having the general structure (141-158)-(141-158)-Pro-Cys-Gly, i.e., a dimeric form of the O₁ 141-158

sequence, suggesting the importance of peptide size or steric considerations in the ELISA results. For reasons which are not clear at this time, the only reactivity observed when the cross-reactive A₂₄ MAbs were assayed against the O₁ tea-bag set of peptides was a low but significant reactivity with 12-mer peptides corresponding to the C terminus of the 141-158-Pro-Cys-Gly sequence, namely QVLAQKVARTPC and MAb 31DC7, i.e., a different reactivity to that seen with 31DF4 and the homologous tea-bag set. The level of cross-reactivity seen with the A₂₄ MAbs and the O₁ and A₂₄ peptides was not reflected in ELISA assays with the different viruses in which little or no cross-reactivity was observed. Only one of the C₃ MAbs reacted with more than one peptide. Figure 2 shows that 7JA1 recognized each of the three

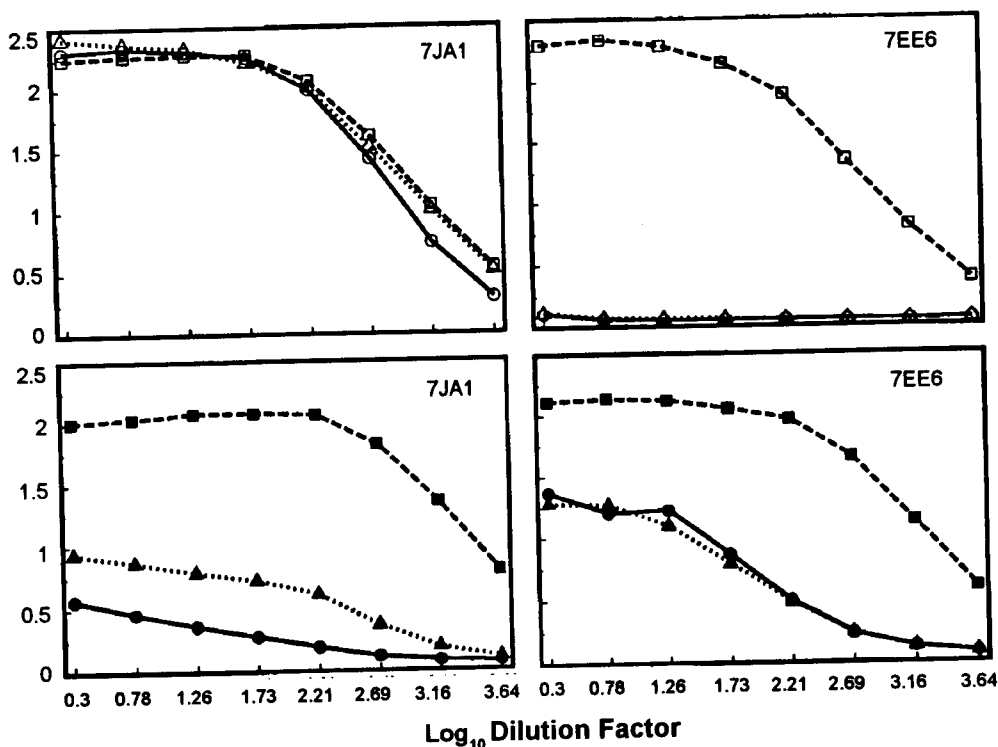


Figure 2. ELISA of two C_3 Indaial MAbs (7JA1 and 7EE6) against three synthetic peptides and three viruses. Open and closed squares are C_3 Indaial peptide Z_c-X_c and virus respectively, open and closed triangles are A_{24} peptide $C-C-X_A-P-P-S-Z_A-P-C-G$ and virus respectively, and open and closed circles are O_1 Kaufbeuren peptide $C-C-X_o-P-P-S-Z_o-P-C-G$ and O_1 Campos virus respectively. See Materials and Methods for full peptide sequences.

peptides to an equal extent but was relatively specific in its reaction with the C_3 virus. In contrast, another C_3 MAb, 7EE6, only recognized the C_3 peptide but was considerably more cross-reactive in ELISA with the three viruses (figure 2). In keeping with its peptide specificity, 7EE6 only neutralized the homologous C_3 virus in serum neutralization tests. MAb 7JA1 also recognized the O_1 and A_{24} tea-bag sets in the 200-213 region of the peptide (figure 1) and is the only clear example in the present work of reactivity at this site. In the ELISA shown in figure 1, 7JA1 also appeared to react with several peptides in the Pro-

Ser-141-158-Pro-Cys-Gly sequence although the signal strength for these peptides was considerably weaker than with the 200-213 sequences. The O.D. values for the latter were in excess of 2.

DISCUSSION

The antigenic complexity of FMDV has been demonstrated in a number of studies utilizing MAbs (2,3,10,11,14,16). Mateu et al. (14) screened 31 South American isolates and 15 European isolates of the C serotype against a large panel of

C virus MABs, which included many of those indicated in table 1. They suggested the existence of at least 12 epitopes involved in the neutralization of viruses of this serotype. More recently they reported that 23 of 36 MABs tested recognized VP₁, and distinguished at least 13 virion conformation-independent epitopes involved in neutralization of FMDV type C (13). Furthermore, at least 10 distinguishable, overlapping epitopes were attributed to VP₁ residues 138-150. Kitson et al. (10) sequenced single and multiple neutralizing MAB resistant viruses of type O FMDV, on the basis of which they proposed four major sites for this serotype. Site 1 was associated with amino acids in the 140-160 sequence of VP₁ and its C terminus (residue 208) and was considered to be an essentially conformation-independent epitope whereas the other three sites were considered to be conformational sites in nature. Site 2 involved residues 70-77 and 131 of VP₂, site 3 involved residues 43-48 of VP₁ and site 4 involved residue 58 of VP₃. Using the MAB OC3 and an OC3 resistant mutant, Crowther et al. (3) recently proposed a fifth conformation-dependent site. However, the recognition of the VP₁ 141-158 region by the MAB OC3 (present work) and the amino acid changes observed in this sequence in the OC3 resistant mutant (3) indicate a very close association between sites 1 and 5 of the O₁ serotype. Kitson et al. (10) also reviewed the literature on antigenic sites of the A serotype. Site 1 consisted of residues in VP₁ 140-160 as well as involving several amino acids at the C terminus of VP₁. Residues 175 and 178 of VP₃ were also implicated for A₁₂ virus. Site 2 involved residues within VP₂ only, site 3 involved amino acids around position 170 of VP₁, and site 4 involved residues 58-61, 69-70, 136-139 and 195 of VP₃. The variability in numbers of defined antigenic sites per serotype is due to a number of factors. For example, some authors have reported multiple sites for a given sequence (13) considered by others to be a single site. Also, the number of sites reported for a given virus strain may reflect the intensity of the investigation and the number of MABs available.

A key question in these studies is the relevance of the sites identified to protection of the

host. Certainly, site 1 has been considered important for many years based on observations such as the considerable diminution in immunogenicity of vaccines following treatment of virus with trypsin (5) and the ability to protect animals with synthetic peptides representing this site (7). With the O serotype there is also persuasive evidence from Crowther et al. (3) suggesting the importance of all of the four/five antigenic sites of this serotype. Their work demonstrated that recognition by post-infected or vaccinated cattle sera against the parental strain was only negated with a MAB escape mutant virus in which all four/five antigenic sites had changed. There is evidence from field isolates that sites other than site 1 may be important in protection. Feigelstock et al. (8) attributed the failure of the vaccine strain C₃ Resende Br/55 to protect cattle against the field isolate C₃ Argentina/84 to changes in sequence at three antigenic sites other than VP₁ 135-160 and 200-213.

In the present work, a considerable number of the MABs, but particularly those against the A₂₄ and C₃ viruses, recognized VP₁ 141-158. This has implications for the MAB groups used to analyse viruses submitted to PANAFTOSA (1). For example, of the eight A₂₄ MABs and one C₃ MAB normally used to screen A serotype viruses, five recognized VP₁ 141-158. Of the nine C₃ MABs normally used, five recognized VP₁ 141-158. This is not to say that each of the five MABs within a group is recognizing exactly the same epitope. Indeed, the data of Mateu et al. (13) demonstrated at least 10 distinguishable epitopes within VP₁ 138-150 and the unique patterns observed by Alonso et al. (1) when they examined the reactivities of the MABs against a large number of viruses suggest that the MABs were recognizing distinguishable epitopes. Rather, the present observations emphasize the need to fully characterize MAB libraries in general and the MABs held in PANAFTOSA specifically, with the aim of grouping them in the context of important (relevant) antigenic sites. This ought to include MABs which neutralize weakly or not at all given the fact that *in vitro* neutralization does not necessarily correlate with *in vivo* protection (table 1; ref. 15). However, Mateu et al. (14) made the interesting observation that all of the non-

neutralizing C serotype MAbs in their work reacted equally with all of the South American and European isolates of C virus tested. From this they deduced that the epitopes recognized by these MAbs were highly conserved, and therefore, unlikely to be of significance serologically. Efforts are now directed to producing MAb resistant mutants which will allow grouping of the MAbs and, with selected sequencing, identification of the antigenic sites involved.

Many of the MAbs recognized more than one serotype at the peptide level whereas virus recognition was invariably serotype specific. This was notable with the A₂₄ MAbs, eight of which recognized the O₁ and A₂₄ peptides, whereas two were serotype-specific in the peptide sense. The cross-reactivity observed with both the A and O serotypes was attributed to the 141-158 region of VP₁ in contrast to the highly cross-reactive C₃ MAb 7JA1 which clearly recognized peptides in the 200-213 region (present work; ref. 13). There are several aspects in relation to cross-reactivity which merit further comment. Despite the absence of cross-reactivity and/or cross-protection between serotypes following infection or multiple vaccination with whole virus, it is clear that cross-reactive antibodies can be stimulated under some circumstances. For example, the neutralizing MAb 7EE6 recognizes a determinant common to all three serotypes albeit to differing extents. In addition, 7JA1 recognizes the 200-213 region of VP₁ of at least three serotypes which, in the form of the synthetic peptide Cys-Cys-(200-213)-Pro-Pro-Ser-(141-158)-Pro-Cys-Gly stimulates cross-reactive anti-peptide antibodies and cross-protection in a guinea pig challenge model (6, 7). It is also interesting to note that cross-reactive sites were identified in the 141-158 region of VP₁ by some of the A₂₄ and O₁ MAbs in the present study. The intriguing question is whether it will be possible to design novel vaccines which will allow the presentation of conventional virus particles or, more probably, synthetic or recombinant antigens, to the immune system of the host in such a way as to stimulate preferentially the desired antibody population.

REFERENCES

1. ALONSO, A., GOMES, M.P.D., RAMALHO, A.K., ALLENDE, R., BARAHONA, H., SÖNDAHL, M.S., OSORIO, F.A. Characterization of foot-and-mouth disease virus by monoclonal antibodies. *Viral Immunol.*, 6 (3): 219-228, 1993.
2. BARNETT, P.V., OULDRIDGE, E.J., ROWLANDS, D.J., BROWN, F., PARRY, N. Neutralizing epitopes of type O foot-and-mouth disease virus. I. Identification and characterization of three functionally independent, conformational sites. *J. Gen. Virol.*, 70: 1483-1491, 1990.
3. CROWTHER, J.R., FARIAS, S., CARPENTER, W.C., SAMUEL, A.R. Identification of a fifth neutralizable site on type O foot-and-mouth disease virus following characterization of single and quintuple monoclonal antibody escape mutants. *J. Gen. Virol.*, 74: 1547-1554, 1993.
4. CROWTHER, J.R., McCULLOUGH, K.C., DE SIMONE, F., BROCCHI, E. Monoclonal antibodies against FMDV: applications and potential use. In: *FAO. Report of a Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease*. Brescia, Italy, 26-28 June 1984.
5. DOEL, T.R., COLLEN, T. Qualitative assessment of 146S particles of FMDV in preparations destined for vaccines. *J. Biol. Standard.*, 10: 69-81, 1982.
6. DOEL, T.R., DOEL, C.M.F.A., STAPLE, R.F., DIMARCHI, R. Cross-reactive and serotype specific antibodies against foot-and-mouth disease virus generated by different regions of the same synthetic peptide. *J. Virol.*, 66: 2187-2194, 1992.
7. DOEL, T.R., GALE, C., do AMARAL, C.M.C.F., BROOKE, G., MULCAHY, G., DIMARCHI, R. Heterotypic protection induced by synthetic peptides corresponding to three serotypes of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.*, 64: 2260-2264, 1990.
8. FEIGELSTOCK, D., MATEU, M.G., PICCONE, M.E., DE SIMONE, F., BROCCHI, E., DOMINGO, E., PALMA, E.L. Extensive antigenic diversification of foot-and-mouth disease virus by amino acid substitutions outside the major antigenic site. *J. Gen. Virol.*, 73: 3307-3311, 1992.
9. HOUGHTEN, R.A. General method for the rapid solid phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interactions

- at the level of individual amino acids. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 82: 5131-5135, 1985.
10. KITSON, J.D.A., McCAHON, D., BELSHAM, G.J. 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: 26-34, 1990.
 11. McCAHON, D., CROWTHER, J.R., BELSHAM, G.J., KITSON, J.D.A., DUCHESNE, M., HAVE, P., MELOEN, R.H., MORGAN, D.O., DE SIMONE, F. Evidence for at least four antigenic sites on type O foot-and-mouth disease virus involved in neutralisation: identification by single and multiple site monoclonal antibody resistant mutants. *J. Gen. Virol.*, 70: 639-645, 1989.
 12. MAKOFF, A.J., PAYNTER, 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 Acid Res.*, 10: 8285-8295, 1982.
 13. MATEU, M.G., MARTINEZ, M.A., CAPUCCI, L., ANDREU, D., GIRALT, E., SOBRINO, F., BROCCHI, E., DOMINGO, E. 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: 629-637, 1990.
 14. MATEU, M.G., SILVA, J.L., ROCHA, E., BRUM, D.L., ALONSO, A., ENJUANES, L., DOMINGO, E., BARAHONA, H. Extensive antigenic heterogeneity of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *Virology*, 167: 113-124, 1988.
 15. MULCAHY, G., PULLEN, L.A., GALE, C., DIMARCHI, R.D., DOEL, T.R. Mouse protection test as a predictor of the protective capacity of synthetic foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine*, 9: 19-24, 1991.
 16. 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.
 17. SILVA, J.L., KANASHIRO, M.M., BRUM, D.L. Producción y caracterización de anticuerpos monoclonales contra la fiebre aftosa. /Production and characterization of monoclonal antibodies against foot-and-mouth disease virus. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 59: 77-92, 1993.

Announcement

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

MEDICIÓN DE NIVELES DE ANTIBIÓTICOS EN VACUNAS OLEOSAS ANTIAFTOSA POR MÉTODOS QUÍMICOS

J. TORROBA¹, V.M. VARELA-DÍAZ², E.C. VIVINO¹, J.A. MESQUITA²

¹*Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis (OPS/OMS)*

Casilla 3092 - Correo Central, 1000 Buenos Aires, Argentina

²*Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS)*

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

RESUMEN. El control de calidad de las vacunas contra la fiebre aftosa actualmente comprende pruebas de esterilidad, inmunogenicidad e inocuidad, pero no se hacen estimaciones de componentes potencialmente alergénicos. Este artículo informa los resultados de un estudio para seleccionar las condiciones óptimas de trabajo para la utilización de la cromatografía en capa fina (TLC) en la determinación de los niveles de penicilina, neomicina y polimixina en vacunas oleosas antiaftosa. Se describen los procedimientos de elección para el quiebre de la emulsión y para extraer, purificar, concentrar, identificar y cuantificar los antibióticos. Se presentan los resultados obtenidos al examinar por TLC una serie de vacunas oleosas antiaftosa disponibles comercialmente. Los hallazgos se analizan en términos de la aplicación de esta metodología para el control de la calidad de estos inmunógenos y para el estudio de las reacciones posvacunación.

En general, los laboratorios de control de vacunas analizan básicamente tres aspectos de los inmunógenos elaborados en su esfera de influencia. En las vacunas antiaftosa, se utilizan pruebas de *potencia* que exigen que los inmunógenos sean capaces de proteger al 75 por ciento de los bovinos a los 90 días después de la primovacunación, en pruebas de descarga viral denominadas como pruebas de generalización podal (5,20). Para disminuir costos y prevenir la diseminación ambiental del virus, también se emplea la expectativa porcentual de protección, estimada a partir de pruebas de seroprotección en ratones (9).

El control de calidad de estas vacunas incluye, además, pruebas de *esterilidad* realizadas mediante la inoculación de medios de cultivo para detectar contaminantes microbianos que podrían afectar la inmunogenicidad y estabilidad de las vacunas, o bien infectar a los animales que las reciben. Finalmente, se llevan a cabo pruebas de *inocuidad* para prevenir el gran riesgo que representa una vacuna que contenga partículas virales infecciosas, así como para analizar la tolerancia de los animales a la vacunación y revacunación (1,2,5,10).

Desde los comienzos de la vacunación periódica contra la fiebre aftosa se han registrado problemas posvacunales de diversa índole, que incluyen reacciones locales o generalizadas compatibles con manifestaciones alérgicas (3,4,6-8, 11,13-16,19). Si bien su frecuencia parece ser de

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

escasa significación, estas pueden ocasionar trastornos en algunas áreas circunscriptas. Sin embargo, hasta el momento no se ha contemplado la incorporación de alguna prueba que permita determinar los niveles de los componentes potencialmente alergénicos en las vacunas. Esto sería de interés para: establecer asociaciones entre los valores de los distintos alérgenos y la aparición y frecuencia de reacciones; definir los niveles de estas sustancias que son compatibles con la ausencia o disminución de las reacciones; mejorar los procedimientos de control de calidad de vacunas y, por consiguiente, favorecer la marcha de los programas de inmunización antiaftosa.

En este informe se describen los estudios realizados a fin de disponer de un procedimiento que permita determinar los niveles de antibióticos en distintos lotes de vacunas antiaftosa. La decisión de dar prioridad a la evaluación de estos agentes antimicrobianos se fundamentó en que los mismos constituyen uno de los componentes vacunales más frecuentemente asociados (3,4,6,8,11,13-15,19) a la aparición de manifestaciones alérgicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Dada la reconocida utilidad de la cromatografía en capa fina (TLC) para identificar y clasificar antibióticos, separarlos en mezclas, y controlar su pureza, se eligió este procedimiento para determinar los productos contenidos en las vacunas, seguido por el empleo de métodos químicos de revelado para localizar las zonas correspondientes a los distintos antibióticos. La elección del procedimiento cromatográfico se basó en su simplicidad y facilidad de ejecución; en que no requiere de instrumental costoso, y puede efectuarse con el equipamiento habitual de un laboratorio microbiológico; en que cubre una amplia gama de antibióticos, y su sensibilidad permite detectar pequeñas cantidades; y en que no requiere reactivos raros, peligrosos o costosos. Además, la repetibilidad, reproducibilidad y especificidad del procedimiento son adecuadas (17,18).

El enfoque consistió en seleccionar inicialmente las condiciones óptimas de trabajo para la ejecución de cada una de las cuatro etapas del

proceso analítico, o sea: el quiebre de la emulsión; la extracción de los antibióticos; su purificación/concentración; y finalmente, su identificación y cuantificación por TLC.

Definidas estas condiciones, el procedimiento se aplicó para estimar los niveles de los antibióticos presentes en algunos lotes de vacunas antiaftosa sometidos por los productores a los organismos oficiales de control de la Argentina y de Colombia, que gentilmente los proveyeron con este propósito.

Para la puesta a punto de estas cuatro etapas, se usaron como patrones los antibióticos (12) comúnmente agregados a las vacunas antiaftosa disponibles en el mercado, específicamente los siguientes: a) solución patrón de penicilina G potásica de 1,00-0,50 y 0,25 mg/ml; b) solución patrón de sulfato de neomicina de 2,00-1,00 y 0,50 mg/ml; c) solución patrón de polimixina B de 0,100-0,050 y 0,025 mg/ml.

Igualmente, se empleó como referencia una vacuna antiaftosa oleosa, elaborada en la Planta Piloto del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (PANAFTOSA). A esta vacuna, así como a las otras de PANAFTOSA empleadas en este estudio, se le agregó las cantidades de 250 UI de penicilina, 0,56 mg de sulfato de neomicina, 125 UI de sulfato de polimixina, y 6,2 ng de Fungizone por cada 5 ml de vacuna (consistente de partes iguales de la suspensión de virus inactivado en medio de cultivo celular, y de la fase oleosa).

Se consideró prioritario optimizar el procedimiento general de *extracción* de los antibióticos de la matriz de la vacuna antiaftosa empleada como vacuna de referencia. A tal efecto, se ensayaron procedimientos de extracción en fase líquida a pH diferentes empleando diversos sistemas de buferización. Igualmente, se ensayaron distintos sistemas de *purificación* del extracto acuoso de la vacuna mediante particiones con solventes orgánicos, y por desarrollo de TLC en sentidos opuestos (desarrollo antiparalelo), y por desarrollo múltiple en el mismo sentido.

Originalmente se había planteado que podría ser promisorio el empleo del sistema de extracción en fase acuosa, y la posterior purificación mediante desarrollo múltiple por TLC. No obstante, las

recuperaciones y la completa separación de fases no fueron satisfactorias al no lograrse el efectivo quiebre de la emulsión con cloroformo. Así, se constató la permanencia de una fase intermedia muy estable y de extensión variable, colocando al sistema en el borde del límite de detección. Esto implicaría trabajar con estandarización interna, que por lo engorroso sería impráctico, y necesitaría buscar y seleccionar una sustancia adecuada para ello. Sin embargo, estas dificultades se obviaron al efectuar el quiebre de la emulsión con diclorometano y la purificación mediante extracción en fase sólida (SPE).

Por otra parte, se procedió a concentrar los extractos con el propósito de alcanzar los niveles de concentración necesarios para el método de visualización elegido. A tal efecto, se ensayó la reducción de volumen mediante *concentración* por arrastre con aire a baja temperatura, y por destilación azeotrópica (agua/etanol y agua/acetona) también a baja temperatura, a fin de no alterar la estructura de los antibióticos. Se halló que la concentración de la fase acuosa mediante arrastre con corriente de aire a baja temperatura era más efectiva para reducir el volumen del extracto vacunal.

Con el propósito de optimizar el método para separar por cromatografía los antibióticos de interés, se ensayaron diversos sistemas de desarrollo sobre *fase normal* (siete mezclas de solventes binarios, ternarios y cuaternarios) y uno sobre *fase inversa*, concluyéndose que el más adecuado era el sistema en fase normal usando placas de silicagel 60. Se optó por una fase móvil cuaternaria para la neomicina y polimixina, y un sistema binario para la penicilina y los antibióticos relacionados. Debido a las características de estos grupos fue necesario emplear diferentes reacciones de revelado, así como distintos sistemas de desarrollo cromatográfico.

A fin de disponer de un procedimiento de visualización acorde con el problema analítico planteado, o sea, que permitiese alcanzar niveles de detección de aproximadamente 2 µg de cada antibiótico, se ensayaron dos métodos para el revelado de placas. Estos se basaron en la formación de *compuestos coloreados* (empleando azida

sódica/I₂, I₂/almidón o ninhidrina-ácido acético) y en la formación de *derivados fluorescentes* (por derivatización con fluorescamina) para mejorar la sensibilidad de la detección.

Sobre esta base, se seleccionó el revelado con I₂/almidón para la detección de los antibióticos de la familia de las penicilinas, y a la ninhidrina/ácido acético para aquellos de las familias de la polimixina y la neomicina. Además, se concluyó que el correcto funcionamiento del sistema por fluorescencia justifica su utilización como procedimiento alternativo o complementario de la coloración.

Los antibióticos se identificaron en base a su ubicación en la placa respecto de su patrón respectivo. A su vez, la cantidad de antibiótico en la mancha cromatográfica se estimó mediante la comparación visual contra los patrones correspondientes.

La metodología para la ejecución del procedimiento cromatográfico elegido para la determinación de antibióticos en vacunas antiaftosas se describe en el cuadro 1. Además, los reactivos y los materiales (17) que se utilizan a tal efecto se indican en los cuadros 2 y 3, respectivamente.

Una vez normatizado, el procedimiento, cromatográfico fue aplicado para determinar las concentraciones de penicilina, polimixina y neomicina, respectivamente, en 10 lotes de vacuna antiaftosa oleosa. De éstos, siete fueron producidos por empresas comerciales de la Argentina y de Colombia, mientras que los tres lotes restantes habían sido elaborados en la Planta Piloto de Producción de Vacunas de PANAFTOSA. Los hallazgos sobre el particular se presentan en el cuadro 4.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En general, se constató que los valores de polimixina y penicilina registrados para todos los lotes de vacunas comerciales analizados resultaron comparables a los de las vacunas elaboradas en PANAFTOSA. En el caso de la neomicina, sin embargo, la situación fue diferente. Así, aunque las tres vacunas de PANAFTOSA y seis de las vacunas

Cuadro 1. Procedimientos de cromatografía para la determinación de niveles de antibióticos en vacunas oleosas antiaftosa

1. Extracción

Las vacunas se llevan a temperatura ambiente, se agitan por dos minutos, e inmediatamente se recolectan 3 ml para la extracción, los que se introducen en un tubo de 10 ml con tapón de vidrio esmerilado. Tras agregar 6 ml de diclorometano y 0,5 ml de agua, los tubos se tapan y se agitan tres minutos en un vortex, y se dejan reposar 3 minutos. Se centrifuga a 2000 rpm por 3 minutos. La fase superior acuosa se transfiere a un tubo de 5 ml, usando una pipeta gotero. Al residuo oleoso se le agrega 1 ml de agua y se repite el procedimiento dos veces. Los extractos acuosos se reúnen y concentran hasta aproximadamente 1 ml, bajo corriente de aire a 60°C.

2. Elución

Se coloca un tubo colector (#1) bajo la columna de extracción en fase sólida. La fase acuosa proveniente de las extracciones se vierte en la columna, regulándose el vacío aplicado hasta obtener un caudal de 1-2 gotas por segundo. El recipiente de los extractos se lava con 0,5 ml de agua, la que se agrega a la columna. Se eluye con 1 ml de metanol. (cuadro 2). Se coloca otro colector (#2) bajo la columna y se eluye con 5 ml de metanol. Se cambia al próximo colector (#3), y se eluye con 3 ml de acetona. Finalmente, se coloca el último colector (#4) y se eluye con 6 ml de la Mezcla Eluyente II (cuadro 2).

3. Concentración

Los recipientes conteniendo el eluato de los colectores #2 y #4 respectivamente, se colocan en un baño de agua o aire a 40°C aproximadamente. Se hace incidir una suave corriente de aire limpio y seco sobre su superficie, agitando periódicamente a medida que se concentre, con un vortex o manualmente, para lavar las paredes. Concentrar hasta 0,2 ml.

4. Cromatografía en capa delgada

Para la identificación y evaluación de los antibióticos extraídos de las vacunas, se procede según se detalla a continuación.

4.1. Siembra y elución. Sobre la placa con fase reversa, se siembran 5 µl de los concentrados recolectados del colector #2 y de los patrones de penicilina, respectivamente. Se desarrollan utilizando la Mezcla Eluyente I (cuadro 2). Luego, sobre cromatofolio con silicagel se siembra la misma cantidad de los concentrados obtenidos del colector #4 y de los patrones de neomicina y polimixina, desarrollándolos con la Mezcla Eluyente II (cuadro 2). En cada caso, se deja un espacio de 1,5 cm entre cada siembra. Desde el punto de siembra, éstos se corren 12 cm con la mezcla eluyente correspondiente. La placa se retira de la cuba cromatográfica y se la seca exponiéndola a una corriente de aire caliente.

4.2. Revelado. Las placas para determinar penicilina se introducen en una cámara con pequeñas cantidades de cristales de yodo. Se las deja hasta que aparezcan las manchas amarillas en los patrones y se prolonga la exposición al vapor de yodo por dos minutos adicionales. Se las retira de la cuba y se exponen al aire hasta que solamente se vean esas manchas y el resto de la placa permanezca blanca. Para aumentar la sensibilidad, se asperja con solución de almidón. Las manchas violetas que aparecen persisten durante varias horas, mientras que las manchas amarillas formadas por el yodo desaparecen antes de una hora.

La placa para determinar polimixina y neomicina se asperja con la solución de ninhidrina (cuadro 2). Se deja reaccionar durante aproximadamente 5 minutos en una estufa a 55 °C, hasta que aparezcan manchas violetas en los puntos correspondientes a cada antibiótico.

5. Identificación y evaluación

Los antibióticos se identifican en base a su posición en la placa coincidentes con el respectivo patrón. La cantidad de antibiótico se estima en la mancha cromatográfica mediante la comparación visual de las manchas de las muestras y los patrones.

6. Cálculo

Los miligramos del antibiótico por ml de vacuna se determinan dividiendo los microgramos obtenidos en el punto anterior, por un factor de 75.

Cuadro 2. Reactivos utilizados para la determinación de antibióticos en vacunas oleosas antiaftosa por cromatografía en capa fina*

Se emplea Diclorometano PA, metanol PA, acetona PA, amoniaco PA.

Mezcla Eluyente I: metanol PA, solución 0,1 M de fosfato dipotásico 0,1 M 6.4.

Mezcla Eluyente II: metanol PA, acetona PA, cloroforno, amoniaco PA (c) 3:2:2:2.

Solución reveladora: Disolver 0,30 g de ninhidrina PA (Cat. Riedel de Haen 33437) en 100 ml de N-butanol. Luego, agregar 3 ml de ácido acético glacial.

Yodo resublimado, (Cat. Fisher 135-100).

Solución de almidón soluble: (Cat. Difco 0178-17) al 1% en agua destilada.

comerciales se inscribieron dentro del mismo intervalo de valores obtenidos para este antibiótico, el nivel de neomicina registrado para la restante vacuna comercial (#3) fue marcadamente superior al de todas las otras. Estos hallazgos se reprodujeron de manera idéntica, en análisis repetidos.

Esencialmente, estas observaciones demuestran que la TLC permite determinar los niveles de antibióticos presentes en vacunas oleosas antiaftosa, y que por su sensibilidad, reproducibilidad, especificidad, sencillez y bajos costos se la puede incorporar para el control de calidad de estos inmunógenos. Su empleo para el análisis del producto final brinda información fidedigna que podría ser utilizada para evaluar el proceso de producción. Así, la detección de altos niveles de antibióticos podría ser indicativo de la existencia de problemas de contaminación en la obtención del sustrato celular, y/o en la etapa de inoculación de partículas virales para la preparación del antígeno

* 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.

vacunal. La resolución de estas dificultades puede representar también un ahorro en los gastos ocasionados por los antibióticos agregados durante la producción del inmunógeno, así como el logro de un producto de mejor calidad. Además, la disponibilidad de información sobre los antibióticos presentes en los distintos lotes de vacuna aplicados en el terreno ofrece la posibilidad de evaluar su relación con las reacciones posvacunales con las que podrían estar asociados.

Por otra parte, los hallazgos del presente estudio también sugieren la conveniencia de ampliar el espectro de los agentes antimicrobianos que se pueden detectar en vacunas antiaftosa por TLC para un control de calidad más completo. Debido

Cuadro 3. Materiales requeridos para la determinación de antibióticos en vacunas oleosas antiaftosa*

Tubos de 10 ml con tapón de vidrio esmerilado. Pipetas gotero Pasteur cortas de 146 mm (Cat. Fisher 13-678-70-B). Tubos de ensayo de 5 ml. Tubos de Millie de 4 ml de capacidad, graduados en su parte inferior al 0,1 ml (Cat. Kontes, N° K.570050-0425).

Columnas para cromatografía de 7 mm de diámetro interior y 80 mm de altura, con placa de vidrio sinterizado en la base. Alternativa: usar jeringas hipodérmicas con un disco de papel de filtro en su parte inferior, para impedir que pase el Silicagel. Cargadas con 600 mg de Silicagel, malla 100-120 (Cat. Fisher, 5679). Otra opción: columnas preparadas comercialmente (Worldwide Monitoring Corp, SiL 153).

Micropipetas de 5 µl o jeringas Hamilton de 10 µl (701 N). Cromatofolios de Silicagel 60, espesor de capa 0,2 mm (Cat. Merck, 5553). Cromatoplasmas con fase reversa de n-octilo (Cat. Whatman, 4808-820). Cubas para cromatografía y aspersor. Baño o bloque calefactor en condiciones de mantenerse entre 30 y 60°C.

Sistema de suministro de aire comprimido. Dispositivo que permita suministrar una corriente de aire seco, preferentemente caliente, sobre la superficie del líquido a evaporar (por ej., agujas de acero inoxidable o pipetas Pasteur). Estufa que pueda mantenerse a 55 °C de temperatura.

Cuadro 4. Niveles de tres antibióticos detectados en 10 lotes de vacuna antiaftosa oleosa elaborados por empresas comerciales y por PANAFTOSA*

N° Vacuna	Producto	Polimixina	Penicilina	Neomicina
1	Comercial	0,020	0,060	ND
2	Comercial	0,025	0,050	0,002
3	Comercial	0,025	0,050	0,140
4	Comercial	0,030	0,070	0,002
5	Comercial	ND	0,030	ND
6	Comercial	0,025	0,050	0,002
7	Comercial	0,035	0,070	ND
8	PANAFTOSA	0,020	0,040	ND
9	PANAFTOSA	0,028	0,085	0,003
10	PANAFTOSA	0,025	0,080	0,002

* Los valores de cada concentración se expresan en miligramos de antibiótico por mililitro de vacuna oleosa. ND = no detectado.

a su asociación con reacciones posvacunales en el pasado (3,13,14,15), la determinación de estreptomycin y también del Merthiolate en vacunas antiaftosa se considera de particular interés para nuestros laboratorios.

REFERENCIAS

- ALONSO FERNANDEZ, A., SONDAHL, M.S., ABARACON, D., FERREIRA, M.E. Control de inocuidad en vacunas antiaftosa hidroxido-saponinadas mediante la elución y concentración del antígeno. *Innocuity control of aluminum-hydroxide saponin foot-and-mouth disease vaccines by elution and concentration of the antigen. Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 33-34: 53-59, 1979.
- ANDERSON, E.C., CAPSTICK, P.B., MOWAT, G.N. In vitro method for safety testing of foot-and-mouth disease vaccines. *J. Hyg.*, 68: 159-172, 1970.
- AROSTEGUI, F.J., CAGGIANO, A.F., GATTO, F. Crisis anafiláctica producida por vacuna antiaftosa. Consideraciones clínicas. Segunda parte. *Gac. Vet.*, 25 (156): 308-312, 1963.
- BULMAN, G.M. Hipersensibilidad post-vacunal en la inmunización antiaftosa. Primera comprobación en Bolivia. *Gac. Vet.*, 40 (330): 285-292, 1978.
- CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA. Manual de procedimientos para el control de vacuna antiaftosa. Rio de Janeiro, PANAFTOSA, 1980. 47p. (Serie de manuales técnicos, 2).
- CHEPUKIN, A.V., ONUFRIEV, V.P., MURAV'EV, V.K., CHEKHOVSKII, G.I. Anaphylactic reactions in cattle after foot and mouth disease vaccination. *Veterinariya (Moscow)*, 5: 64-65, 1975. In: *FMD Bull.*, 14 (9): 75/105, 1975.
- FEDIDA, M., DANNACHER, G., BELLI, P., COUDERT, M. Accidents survenus apres vaccination anti-aphteuse au cours de la campagne 1984-1985: les causes possibles. *Rec. Med. Vet.*, 162 (8-9): 947-971, 1986.
- GINANNI, C., MAGLIONE, E. Contributo allo studio delle reazioni anafilattiche precoci nella vaccinazione antiaftosa dei bovini. *Att. Soc. It. Buiatria*, 4: 162-171, 1972.
- 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.
- HENDERSON, W.M. Significance of tests for non-infectivity of foot-and-mouth disease vaccines. *J. Hyg.*, 50 (2): 195-208, 1952.
- JOVANOVIC, D., MARINAC, M., DAVCEVSKI, T. Allergic reactions in cattle vaccinated against foot and mouth disease. *Vet. Glasn.*, 27 (12): 873-878, 1973. In: *FMD Bull.*, 14 (1): 75/3, 1975.
- MERCK INDEX. 9. ed. New Jersey, Merck & Co, 1976.
- QUIROZ, R., SUTMOLLER, P., MARROETA, M. Factors associated with anaphylactic reactions to chicken embryo foot-and-mouth disease vaccine and flury rabies vaccine in cattle of Venezuela. *Am. J. Vet. Res.*, 25 (109): 167-1634, 1964.
- RENES, I. Allergic reactions following vaccination of cattle against foot-and-mouth disease on large farms. *Magyar Allatorv. Lap.*, 31 (2): 115-117, 1976. In: *FMD Bull.*, 15 (10): 76/137, 1976.
- ROSSI, F. Crisis anafiláctica producida por vacuna anti-aftosa. Su etiología. Primera parte. *Gac. Vet.*, 25 (156): 299-307, 1963.

16. SHARMA, S.K., SINGH, G.R., MURTY, D.K. Allergic reactions in buffalo after vaccination with foot-and-mouth disease vaccine. *Indian Vet. J.*, 56: 621, 1979. In: *FMD Bull.*, 19 (6): 80/55, 1980.
17. STAHL and EGON, Thin Layer Chromatography, Oxford, Academic Press, 1965.
18. TOUCHSTONE and SHERMA. Techniques and applications of Thin Layer Chromatography. London John Wiley & Sons, 1985.
19. UBERTINI, B., BAREI, S. Anti-FMD vaccination and immediate anaphylactic reactions. *Vet. Ital.*, 21 (5-6): 366-376, 1970.
20. VIANNA FILHO, Y.L., ASTUDILLO, V., GOMES, I., FERNANDEZ, G., ROZAS, C.E.E., RAVISON, J.A., ALONSO, A. Potency control of foot-and-mouth disease vaccine in cattle. Comparison of the 50% protective dose and the protection against generalization. *Vaccine*, 11 (14): 1424-1428, 1993.

Información

La Comisión Sudamericana para la Lucha contra la Fiebre Aftosa (COSALFA), integrada por los Directores de Salud Animal de los países de América del Sur, se reúne anualmente y sirve de cuerpo asesor para el Director de PANAFTOSA. Es el organismo de promoción, coordinación y evaluación de los programas nacionales, proyectos subregionales y convenios de frontera de los países de la Región, en materia de fiebre aftosa y otras enfermedades vesiculares.

En marzo de 1985, la COSALFA fue institucionalizada por los Ministros de Relaciones Exteriores de los países de América del Sur como Comisión Permanente Subregional, actuando el Ministerio de Relaciones Exteriores del Brasil como depositario del Convenio. Tiene también como función la adopción de normas y medidas para evitar la introducción de enfermedades exóticas en América del Sur.

Anuncio

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.

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.

1994 - XXI Reunión de la COSALFA. 14 y 15 de abril de 1994, Lima, Perú
Seminario Internacional sobre los Sistemas de Atención de la Salud Animal ante los Cambios en el Papel del Estado y de la Comunidad. 11 al 13 de abril de 1994.

MEASUREMENT OF ANTIBIOTIC LEVELS IN FOOT-AND-MOUTH DISEASE OIL VACCINES BY CHEMICAL METHODS

J. TORROBA¹, V.M. VARELA-DÍAZ², E.C. VIVINO¹, J.A.MESQUITA²

¹ Pan American Institute for Food Protection and Zoonoses (PAHO/WHO)
Casilla 3092 - Correo Central; (1000) Buenos Aires, Argentina.

² Pan American Foot-and-Mouth Disease Center (PAHO/WHO)
Caixa Postal 589, Rio de Janeiro 20001-970, RJ, Brasil.

SUMMARY. Quality control of foot-and-mouth disease (FMD) vaccines currently comprises sterility, immunogenicity and innocuity tests but no assessments of potentially allergenic components. This paper reports the results of a study to select the optimal working conditions for rendering thin layer chromatography (TLC) useful for determining the levels of penicillin, neomycin and polymyxin in FMD oil vaccines. Procedures are described for breaking vaccine emulsions and for extracting, purifying, concentrating, identifying and quantifying the antibiotics contained in them. Subsequently, commercially available FMD oil vaccines were examined by these procedures. Findings are discussed in terms of the application of TLC for quality control of immunogens and for studying post-

vaccinal reactions.

In general, vaccine control laboratories basically analyze three aspects of the immunogens manufactured within their sphere of influence. Thus, foot-and-mouth disease (FMD) vaccine *potency* tests, known as podal generalization tests (5,20) require that vaccines are able to protect 75 percent of bovines following viral challenge at 90 days after primary immunization. To lower costs and prevent environmental dissemination of virus, increasing use is being made currently of the expected percent protection based on mouse protection tests (9) for this purpose.

Quality control of FMD vaccines also includes *sterility* tests based on the inoculation of culture media to detect microbial contaminants that may affect vaccine immunogenicity and stability, or alternatively, infect the animals receiving them. Finally, *innocuity* tests are carried out to prevent the great risks which vaccines containing infective viral particles represent, and to analyze the tolerance of animals to vaccination and revaccination (1,2,5,10).

Since the administration of FMD vaccines on a regular periodic basis was initiated, a diversity of post-vaccinal problems which include local or generalized manifestations compatible with allergic reactions, have been recorded (3,4,6-8,11,13-16,19). Although their frequency seems to be of minor significance, they may present a problem in some circumscribed areas. Nevertheless, we are

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

some circumscribed areas. Nevertheless, we are not aware that the possibility has been contemplated of incorporating tests to determine the levels of potentially allergenic components in these and other vaccines. This would be of interest to establish associations between the values of different allergens and the appearance and frequency of reactions; to define the levels of these substances which are compatible with the absence or reduction of reactions; to improve vaccine quality control procedures, and consequently, favor the progress of anti-FMD immunization programs.

Studies reported herein were carried out to develop a procedure which would permit the determination of antibiotic levels in different lots of FMD vaccines. Priority was assigned to these products since among vaccine components, they have been most frequently incriminated (3,4,6,8,11,13-15,19) with the appearance of post-vaccinal allergic manifestations in livestock.

MATERIALS AND METHODS

Considering its widely recognized usefulness for identifying and classifying antibiotics, separating them from mixtures and controlling their purity, thin layer chromatography (TLC) was selected for determining the presence of antibiotics in FMD vaccines, employing chemical methods to identify the zones which correspond to the different antibiotics. Furthermore, selection of TLC was based on the following practical considerations: its simplicity and ease of performance; its capacity to cover a wide range of antibiotics, its sensitivity, which allows for detection of small amounts; it may be performed with equipment usually available in microbiology laboratories; it does not require rare, dangerous, or costly reagents, nor expensive equipments, and it has an adequate repeatability, reproducibility and specificity (17,18).

Initially, the working approach consisted of selecting the optimal working conditions for each of the following four stages of the process: breaking the emulsion, extraction of the antibiotics, their purification and concentration, and finally,

their identification and quantification by TLC.

After defining these conditions, the procedure was applied to determine the antibiotic levels present in a random selection of FMD vaccine lots submitted by producers to the official control agencies of Argentina and Colombia (to whom we are grateful for kindly providing the samples used for this purpose).

For use in these four stages, standards were prepared with the three antibiotics (12) most frequently incorporated into FMD vaccines available commercially in South America, specifically the following: (a) potassium G penicillin standard solution at 1.00-0.50 and 0.25 mg/ml; (b) standard neomycin sulphate standard solution at 2.00-1.00 and 0.5 mg/ml; (c) polymyxin B standard solution at 0.100-0.050 and 0.025 mg/ml.

Furthermore, an FMD oil vaccine manufactured at the Vaccine Pilot Plant of the Pan American Foot-and-Mouth Disease Center (PANAFTOSA) was also used as a reference reagent to set up the four stages of the procedure. During the preparation of this and the other PANAFTOSA vaccines used in this study, 250 IU of penicillin, 0.56 mg of neomycin sulfate, 125 IU of polymyxin sulfate, and 6.2 ng of fungizone were added per every 5 ml of vaccine (which consisted of equal parts of the inactivated virus suspension in tissue culture medium, and the oil phase).

Priority was assigned to the design and optimization of the general procedures for *extraction* of antibiotics from the FMD oil vaccine used as reference. To this effect, procedures were tested for liquid phase extraction at different pH with different buffer systems. Similarly, several systems for *purification* of the aqueous extract of vaccines by partition with organic solvents and by development in opposite directions (anti-parallel development) in TLC and by multiple development in the same phase.

The possibility was first contemplated of using an aqueous phase extraction system and subsequent purification using multiple development by TLC. Nevertheless, recoveries and the complete separation of phases were not at all satisfactory, since the effective destruction of the emulsion was not achieved with chloroform. The

persistence of a very stable intermediate phase of variable dimension became evident, placing the limit of detectability of the system. This required incorporating internal standardization, rendering it cumbersome and thus impractical, and conveyed the need to search for a substance adequate for this purpose. Accordingly, these difficulties were obviated by breaking the emulsion with dichloromethane, and purifying by solid phase extraction (SPE).

On the other hand, extracts were concentrated for the purpose of reaching levels adequate for the selected visualization method. To this effect, the reduction in volume by *concentration* was assayed using air currents at low temperatures or azeotropic distillation (water/ethanol and water/acetone) also at low temperatures in order not to alter the structure of the antibiotics. On this basis, it was found that concentrating the aqueous phase by air currents at low temperatures was more effective for reducing the volume of the vaccine extract.

For the purpose of optimizing the method of separating antibiotics which were of interest by chromatography, a variety of systems for development over a *normal phase* were assessed (seven mixtures of binary, ternary and quaternary solvents) as well as another on *reverse phase*. The conclusion was reached that the system in normal phase using silicagel 60 plates was the most adequate. Options made consisted of using a quaternary mobile phase for neomycin and polymyxin, and a binary system for penicillin and its related antibiotics. Because of the characteristics of these two antibiotic groups, it was necessary to use different chromatographic development systems and staining reactions.

To visualize the localization of antibiotics in the TLC plates and to permit detection levels of approximately 2 μg of each antibiotic, two methods for developing them were assayed. These techniques were based on the formation of *colored compounds* (using sodium azide/ I_2 , I_2 /starch, or ninhydrin-acetic acid) and in the formation of *fluorescent derivatives* (by derivation with fluorescamine) to improve the sensitivity of detection.

On this basis, developing with I_2 /starch was selected for antibiotics of the penicillin family, and ninhydrin/acetic acid for the polymyxin and neomycin families. Also, it was concluded that the correct functioning of the system with fluorescence justifies its usefulness as a complement or alternative to staining procedures.

Antibiotics were identified by virtue of their localization site in the plate in terms of its corresponding standard. The amount of antibiotic in the chromatographic spot was estimated by visual comparisons with the pertinent standards.

The technique for performing the chromatographic procedure selected for determining antibiotics in anti-FMD vaccines is described in table 1. Also, the reagents and materials used (17) for this purpose are indicated in tables 2 and 3, respectively.

The standardized chromatographic procedure was then applied to determine the concentration of penicillin, polymyxin and neomycin in 10 lots of anti-FMD oil vaccine. Of these, seven were manufactured by commercial firms in Argentina and Colombia, while the remaining three lots had been prepared at the Pilot Plant for Vaccine Production, PANAFTOSA. Findings are shown in table 4.

RESULTS AND DISCUSSION

In general, the values for polymyxin and penicillin recorded for all commercial vaccine lots analyzed were comparable to those of the vaccines prepared at PANAFTOSA. However, the situation with neomycin was different. Thus, although the three PANAFTOSA vaccines and six of the commercial immunogens fell within the same range of values, the neomycin level recorded for the remaining commercial vaccine (#3) was markedly higher. Findings were identical in repeated analyses.

Essentially, the above observations demonstrate that TLC is suitable for determining the levels of the antibiotics present in anti-FMD oil vaccines and suggest that this procedure may be

Table 1. Chromatographic procedure for determining antibiotic levels in anti-foot-and-mouth disease oil vaccines

1. Extraction

Test vaccines are allowed to reach room temperature and stirred for two minutes. Immediately, 3 ml are collected for extraction and introduced into a 10 ml tube having a ground glass stopper. After adding 6 ml of dichloromethane and 0.5 ml of water, tubes are stoppered, stirred for 3 minutes in a vortex, and allowed to rest for 3 minutes. Centrifugation is carried out at 2000 rpm for 3 minutes. The supernatant aqueous phase is transferred to a 5 ml tube using a pipette dropper. One ml of water is added to the oil residue and the procedure is repeated twice. All aqueous extracts of vaccines are pooled and concentrated to approximately 1 ml under a 60°C air current.

2. Elution

Place a collecting tube (#1) under the solid phase extraction column. Pour the aqueous phase concentrate obtained from the extractions into the column, regulating the vacuum applied so as to obtain a drop count of 1-2 drops per second. The receptacle containing the extracts is washed with 0.5 ml of water, which is then poured through the column. Elution is carried out with methanol (table 2). Another collecting tube (#2) is placed under the column, eluted with 5 ml of methanol, transferred to the next tube (#3) and eluted with 3 ml of acetone. Finally, the eluate is placed into the last collecting tube (#4), and eluted with 6 ml of the Elution Mixture II (table 2).

3. Concentration

The recipients containing the eluate of collecting tubes #2 and #4 are placed respectively in a water bath or air current at approximately 40°C. A smooth current of clean dry air is placed on its surface, stirring periodically as concentration proceeds, either manually or with a vortex, to wash the walls. The solution is allowed to concentrate until a 0.2 ml volume is reached.

4. Thin layer chromatography

The procedure to identify and evaluate the antibiotics extracted from vaccines is carried out as follows:

4.1 Sample application and elution. Concentrates (5 µl) obtained from collecting tube #2, as well as the penicillin standards, are respectively placed on the reverse phase TLC plate, and then developed using Elution Mixture I (table 2). The same amounts of the concentrates obtained from collecting tube #4 and the neomycin and polymyxin standards are applied on chromatofolio with silicagel and developed with Elution Mixture II (table 2). In each case, a 1.5 cm separation is allowed between neighboring samples. These are then run 12 cm from the application spot, using the corresponding eluting mixture. TLC plates are then removed from the developing chamber for drying in a current of warm air.

4.2 TLC Development. TLC plates for penicillin determinations are placed in a chamber with small amounts of iodine crystals and allowed to remain until yellow spots appear in the sites where standards were applied. Exposure to iodine vapors is then prolonged for two more minutes. Plates are removed and left exposed to air until only the spots are seen and the rest of the TLC plate remains white. To increase sensitivity, plates are sprayed with the starch solution. The purple spots which appear persist for several hours, while the yellow spots formed by iodine disappear within the hour.

TLC plates are sprayed with the ninhydrin solution (table 2) to determine polymyxin and neomycin and allowed to react for approximately 5 minutes in a 55°C oven, until purple stains appear in the sites corresponding to each antibiotic.

5. Identification and evaluation

Antibiotics are identified on the basis of their position in TLC plates vis-à-vis that of the corresponding standard. The amount of each antibiotic in the chromatographic spots is estimated by comparing visually spots formed by each sample of the vaccine extracts, with that of the given reference standard.

6. Calculations

The milligrams of antibiotic per milliliter of vaccine are determined by dividing the micrograms obtained in the preceding stage by a factor of 75.

Table 2. Reagents used for the determination of antibiotics in anti-foot-and-mouth disease oil vaccines by thin layer chromatography*

Dichloromethane PA, methanol PA, acetone PA and ammonia PA are used.

Elution Mixture I: Methanol PA, 0.1 M dipotassium phosphate 0.1 M 6:4 solution.

Elution Mixture II: Methanol PA, acetone PA, chloroform, ammonia PA (c) 3:2:2:2.

Developing solution: Dissolve 0.30 g ninhydrin PA (Riedel de Haen 33437) in 100 ml of N-Butanol. Subsequently, add 3 ml glacial acetic acid.

Resublimated iodine, (Cat. Fisher 135-100).

Starch solution: Soluble starch (Difco 0178-17), 1% in distilled water.

incorporated in the quality control of these immunogens on the basis of its sensitivity, reproducibility, specificity, simplicity and low cost. Furthermore, application of TLC to analyze the final product may provide reliable information which may be used to evaluate the production process. For instance, the detection of high antibiotic levels in vaccines may be indicative of the existence of contamination problems in the harvesting of the cellular substrate and/or at the stage of inoculating viral particles for preparing vaccine antigens. Solving these problems may also represent a savings in the expenditures represented by the addition of antibiotics during production of the immunogen,

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

as well as in obtaining an end-product of better quality. Also, the availability of information on the antibiotics present in the different lots of vaccines applied to animals in the field offers the possibility of evaluating their relationship to the appearance of postvaccinal reactions, should they be reported.

Finally, the findings of the present study are also suggestive of the convenience of expanding the spectrum of antimicrobial agents which may be detected in anti-FMD vaccines by TLC to achieve an optimal quality control. Due to their association

Table 3. Materials required for determination of antibiotic levels in anti-foot-and-mouth disease oil vaccines*

Tubes (10 ml) with ground glass stopper. Short 146 mm, Pasteur Pipette, (Fisher 13-678-70B). 5 ml test tubes. Mills tubes having 4 ml capacity, graduated in the lower portion at 0.1 ml (Kontes No. K 57-0050-0425).

Chromatographic columns: 7 mm interior diameter and 80 mm high, with coarse fritted plate. Alternative: use syringes with a filter paper disk in the lower portion to interfere with passage of Silicagel. Packed with 600 mg Silicagel, mesh 100-120 (Fisher 5679). Another option: commercially-prepared columns (Worldwide Monitoring Corp. SIL 153).

Micropipets of 5 μ l or Hamilton (701 N) 10 μ l syringes. TLC aluminum sheets Silicagel 60F254, sheet thickness 0.2 mm (Merck 5553). Reverse phase TLC plates n-octyl (Whatman 4808-820). Chromatography trays and sprayer. Hot bath or heater with the capacity to maintain between 30 and 60°C.

System for supply of air pressure. Device which permits supply of a dry preferably hot air current over the surface of the liquid to be evaporated (for example, stainless steel needles or Pasteur pipettes).

Oven that can be kept at 55 °C temperature.

Table 4. Levels of three antibiotics detected in 10 foot-and-mouth disease oil vaccine lots manufactured by commercial firms and at PANAFTOSA*

Vaccine No.	Product	Polymyxin	Penicillin	Neomycin
1	Commercial	0.020	0.060	ND
2	Commercial	0.025	0.050	0.002
3	Commercial	0.025	0.050	0.140
4	Commercial	0.030	0.070	0.002
5	Commercial	ND	0.030	ND
6	Commercial	0.025	0.050	0.002
7	Commercial	0.035	0.070	ND
8	PANAFTOSA	0.020	0.040	ND
9	PANAFTOSA	0.028	0.085	0.003
10	PANAFTOSA	0.025	0.080	0.002

* Values for each concentration are expressed in milligrams of the antibiotic per milliliter of oil vaccine. ND = no detected.

with postvaccinal reactions in the past (3,13,14,15), streptomycin and also merthiolate determinations in anti-FMD vaccines are considered of particular interest in our laboratories.

REFERENCES

- ALONSO FERNANDEZ, A., SONDAHL, M.S., ABARACON, D., FERREIRA, M.E. Control de inocuidad en vacunas antiaftosa hidroxido-saponinadas mediante la elución y concentración del antígeno./Innocuity control of aluminum-hydroxide saponin foot-and-mouth disease vaccines by elution and concentration of the antigen. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 33-34: 53-59, 1979.
- ANDERSON, E.C., CAPSTICK, P.B., MOWAT, G.N. In vitro method for safety testing of foot-and-mouth disease vaccines. *J. Hyg.*, 68: 159-172, 1970.
- AROSTEGUI, F.J., CAGGIANO, A.F., GATTO, F. Crisis anafiláctica producida por vacuna anti-aftosa. Consideraciones clínicas. Segunda parte. *Gac. Vet.*, 25 (156): 308-312, 1963.
- BULMAN, G.M. Hipersensibilidad post-vacunal en la inmunización antiaftosa. Primera comprobación en Bolivia. *Gac. Vet.*, 40 (330): 285-292, 1978.
- CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA. Manual de procedimientos para el control de vacuna antiaftosa. Rio de Janeiro, PANAFTOSA, 1980. 47p. (Serie de manuales técnicos, 2).
- CHEPUKIN, A.V., ONUFRIEV, V.P., MURAV'EV, V.K., CHEKHOVSKII, G.I. Anaphylactic reactions in cattle after foot and mouth disease vaccination. *Veterinariya (Moscow)*, (5): 64-65, 1975. In: *FMD Bull.*, 14 (9): 75/105, 1975.
- FEDIDA, M., DANNACHER, G., BELLI, P., COUDERT, M. Accidents survenus apres vaccination anti-aphteuse au cours de la campagne 1984-1985: les causes possibles. *Rec. Med. Vet.*, 162 (8-9): 947-971, 1986.
- GINANNI, C., MAGLIONE, E. Contributo allo studio delle reazioni anafilattiche precoci nella vaccinazione antiaftosa dei bovini. *Att. Soc. It. Buoiatria*, 4: 162-171, 1972.
- 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.
- HENDERSON, W.M. Significance of tests for non-infectivity of foot-and-mouth disease vaccines. *J. Hyg.*, 50 (2): 195-208, 1952.
- JOVANOVIC, D., MARINAC, M., DAVCEVSKI, T. Allergic reactions in cattle vaccinated against foot and mouth disease. *Vet. Glasn.*, 27 (12): 873-878, 1973. In: *FMD Bull.*, 14 (1): 75/3, 1975.
- MERCK INDEX. 9. ed. New Jersey, Merck & Co, 1976.
- QUIROZ, R., SUTMOLLER, P., MARROETA, M. Factors associated with anaphylactic reactions to chicken embryo foot-and-mouth disease vaccine and flury rabies vaccine in cattle of Venezuela. *Am. J. Vet. Res.*, 25 (109): 167-1634, 1964.
- RENES, I. Allergic reactions following vaccination of cattle against foot-and-mouth disease on large farms. *Magyar Allatorv. Lap.*, 31 (2): 115-117, 1976. In: *FMD Bull.*, 15 (10): 76/137, 1976.
- ROSSI, F. Crisis anafiláctica producida por vacuna anti-aftosa. Su etiología. Primera parte. *Gac. Vet.*, 25 (156): 299-307, 1963.

16. SHARMA, S.K., SINGH, G.R., MURTY, D.K. Allergic reactions in buffalo after vaccination with foot-and-mouth disease vaccine. *Indian Vet. J.*, 56: 621, 1979. In: *FMD Bull.*, 19 (6): 80/55, 1980.
17. STAHL and EGON, Thin Layer Chromatography, Oxford, Academic Press, 1965.
18. TOUCHSTONE and SHERMA. Techniques and applications of Thin Layer Chromatography. London John Wiley & Sons, 1985.
19. UBERTINI, B., BAREI, S. Anti-FMD vaccination and immediate anaphylactic reactions. *Vet. Ital.*, 21 (5-6): 366-376, 1970.
20. VIANNA FILHO, Y.L., ASTUDILLO, V., GOMES, I., FERNANDEZ, G., ROZAS, C.E.E., RAVISON, J.A., ALONSO, A. Potency control of foot-and-mouth disease vaccine in cattle. Comparison of the 50% protective dose and the protection against generalization. *Vaccine*, 11 (14): 1424-1428, 1993.

Information

South American Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease (COSALFA), composed of the Animal Health Directors of the South American countries, meets annually and serves as an advisory body to the PANAFOSA Director. It is also the entity that promotes, coordinates and assesses the national programs, subregional projects and border agreements of the Region's countries as regards foot-and-mouth disease and other vesicular diseases.

In March, 1985, the Ministers of Foreign Relations of the South American countries institutionalized COSALFA as a Permanent Subregional Commission. The Foreign Relations Ministry of Brazil acts as the depository of the Agreement. COSALFA is also entrusted with adopting norms and measures to prevent the introduction of exotic diseases into South America.

Announcement

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.

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.

1994 - XXI Regular Meeting of COSALFA. April 14 and 15, 1994, Lima, Peru
International Seminar on the Animal-Health Care Systems and the Changes in the Role of the State and the Community. April 11 to 13, 1994.

DETERMINACIÓN DE PIRÓGENOS EN VACUNAS ANTIAFTOSA OLEOSAS

P. M. COTÍAS¹, V.M. VARELA-DÍAZ², H.S. PAIM², J.A. MESQUITA²

¹*Instituto de Hematologia e Reagentes Sta. Catarina*
Rua Pardal Mallet 26, 20270-280 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

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

RESUMEN. Se efectuaron pruebas de pirogenicidad *in vivo* e *in vitro* en una serie de lotes de vacuna oleosa antiaftosa. Los hallazgos demostraron que normalmente estos inmunógenos no son reactivos en estas técnicas. Se sugiere emplear pruebas de pirógenos en aquellos casos en que se sospecha de problemas de contaminación bacteriana en vacunas antiaftosa, y para la caracterización de las reacciones posvacunales.

La ocurrencia de una amplia variedad de manifestaciones clínicas después de la administración de distintos tipos de vacuna contra la fiebre aftosa, a veces asociadas con estados de hipersensibilidad, ha sido registrada esporádicamente a través de los años (2,4,9). A partir de esas observaciones, se planteó la posibilidad de que, en algunos casos, la reacción posvacunal pudiera resultar de la presencia de pirógenos en los inmunógenos correspondientes. Por tanto, se estimó que la determinación de pirogenicidad en las vacunas antiaftosa sería de interés por su potencial para su inclusión entre los factores a analizar para explicar la aparición de signos posvacunación. Sin embargo, la viabilidad de esta propuesta depende de la demostración de que estos inmunógenos normalmente no revelen reactividad en pruebas de pirógenos.

Actualmente, la pirogenicidad se evalúa *in vivo* e *in vitro* mediante las pruebas de pirógenos en conejo (10) y la técnica del lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL), respectivamente (1,3). LAL es el procedimiento más sensible para detectar endotoxinas de bacterias gramnegativas y puede presentar reacciones con cantidades mínimas, de alrededor de 0,0005 µg de endotoxina por ml (5,6). Además, la prueba de LAL es más rápida, de menor costo, y más sencilla que la prueba de pirogenicidad en conejos.

En general, se considera que una prueba de LAL positiva es específica para la presencia de endotoxina bacteriana (1,3). Sin embargo, una variedad de compuestos que no son lipopolisacáridos, tales como la ribonucleasa, las actividades del sistema de coagulación sanguínea de mamíferos, poli(I), poli(C) y poli(A), poli(U), también producen reacciones positivas. Por este motivo, el hallazgo de un resultado positivo en el examen de una solución desconocida debe interpretarse con cautela (1). Por otra parte, se ha establecido que ciertos compuestos que son piro-

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

génicos en el conejo no necesariamente lo serán también en la prueba de LAL (1).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se examinó una serie de vacunas antiaftosa oleosas para determinar si estos inmunógenos no reaccionan en pruebas de LAL y de conejos para pirógenos. Inicialmente, se examinaron tres lotes seleccionados al azar de vacunas elaboradas en el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS), según lo descrito (8). Posteriormente, se examinaron otros siete lotes de vacuna que habían sido sometidos por empresas comerciales para control de calidad por las autoridades de sanidad animal de Argentina y Colombia, las que gentilmente las suministraron para estos estudios.

Para la detección de pirógenos por LAL en estas vacunas, los reactivos utilizados para la prueba se adquirieron comercialmente (Whittaker Bioproducts Inc., Walkerville MD, USA*) y el procedimiento se efectuó según lo descrito en el prospecto. Esencialmente, el lisado se reconstituyó y se mezcló con partes iguales de la muestra de vacuna. Los tubos se incubaron sin moverse a 37°C durante una hora y se les examinó, invirtiéndolos para detectar la formación del gel. Diluciones dobles del estándar de endotoxina, diluciones de las vacunas en estudio y agua del reactivo LAL sin alterar, sirvieron de controles.

Posteriormente, los mismos lotes de vacunas se examinaron mediante la prueba de pirógenos en conejos, la que se llevó a cabo esencialmente según lo descrito en la Farmacopea de los Estados Unidos (10). Antes de usarse, toda la cristalería se calentó a 250°C durante 30 minutos para que estuviese libre de pirógenos, y se dejó enfriar hasta alcanzar 37°C. Se emplearon grupos de tres conejos adultos New Zealand White, todos del mismo sexo y de aproximadamente 1,5 kg de peso.

* 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.

Los conejos se mantuvieron individualmente en salas especiales libres de ruidos y otras distracciones, acondicionadas a una temperatura uniforme de 22-26°C. El alimento se removió 12 horas antes de efectuar la prueba, pero los animales tuvieron acceso a agua en todo momento.

Los termómetros se insertaron por vía rectal a una profundidad de 7,5 cm por lo menos, 40 minutos antes de inocular las vacunas. En ningún conejo la temperatura fue superior a 39,8°C o inferior a 37,5°C, ni se registraron variaciones mayores de 1°C entre lecturas repetidas, condiciones que hubieran requerido descartarlos según los requisitos de la prueba.

Cada animal se inoculó por vía endovenosa (vena marginal de la oreja) con 0,5ml de vacuna por kg de peso, liberándola lentamente a fin de suministrarla durante un intervalo de 10 minutos. Se inocularon tres conejos con cada vacuna. Otros animales que no fueron inoculados se examinaron en paralelo.

Se registraron lecturas seriadas de temperatura en ocho ocasiones consecutivas, a intervalos de una hora. Los animales se acondicionaron previamente efectuando pruebas en blanco del procedimiento completo, exceptuando la inoculación de las vacunas, así como inoculándolos con solución salina apirogénica.

El criterio para establecer la ausencia de pirógenos en las vacunas consistió en constatar que ninguno de los animales inoculados mostró un incremento en la temperatura de 0,6°C o mayor, en comparación con su respectivo control térmico, o si la suma de los tres incrementos individuales en la temperatura no excedió 1,4°C. El registro de valores superiores se consideró como indicativo de la presencia de pirógenos. En todos los casos, los animales se examinaron clínicamente para detectar signos de sensibilidad al inóculo.

Cabe señalar que el procedimiento indica que, de no cumplirse estas condiciones, la prueba debe repetirse usando cinco conejos. Si menos de tres de ellos presentan aumentos en la temperatura de 0,6°C o más, o si la suma de los tres incrementos máximos no excede 1,4°C, la prueba se considera libre de pirógenos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados demostraron que ninguna de las vacunas examinadas indujo una respuesta de pirógenos en conejos, o de gelificación en la prueba de LAL. Estas observaciones indican que es factible efectuar estos procedimientos en lotes de vacuna asociados con reactividad posvacunal, a fin de asistir en la caracterización de estos cuadros. Esto parece adquirir una utilidad particular en aquellas situaciones en que las inmunizaciones se han llevado a cabo a partir de frascos de vacunas parcialmente usadas que se han mantenido almacenadas en los establecimientos problema, así como cuando se sospechen problemas de contaminación bacteriana durante el proceso de manufactura del inmunógeno.

La búsqueda bibliográfica revela que, en algunos países, se realizan pruebas de pirógenos con fines de control de calidad del producto final, en vacunas antirrábicas para uso humano (7), así como en vacunas humanas de polisacárido meningocócico (6). Sin embargo, la aplicación de investigaciones de pirógenos en vacunas contra el virus de la fiebre aftosa u otros agentes infecciosos no se ha registrado para uso veterinario (5). De ahí que la justificación para su incorporación como rutina queda por demostrarse.

REFERENCIAS

1. ELIN, R.J., WOLFF, S.M. Nonspecificity of the Limulus Amebocyte Lysate test: positive reactions with polynucleotides and proteins. *J. Infect. Dis.*, 128 (3): 349-352, 1973.
2. FEDIDA, M., DANNACHER, G., BELLI, P., COUDERT, M. Accidents survenus après vaccination anti-aphteuse au cours de la campagne 1984-1985: les cause possibles. *Rec. Méd. Vét.*, 162 (8-9): 947-972, 1986.
3. LEVIN, J., TOMASULO, P.A., OSER, R.S. Detection of endotoxin in human blood and demonstration of an inhibitor. *J. Lab. Clin. Med.*, 75 (6): 903-911, 1970.
4. MUSSGAY, M.W. Accidentes y reacciones de las vacunas contra la fiebre aftosa. En: *III Reunión Interamericana sobre el Control de la Fiebre Aftosa y otras Zoonosis*. Buenos Aires, Argentina, 14-17 de abril de 1970. Washington, D.C., OPS/OMS, 1971. p. 82-87 (Pub. Cien., 218).
5. OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. *Manual of standards for diagnostic tests and vaccines*. 2.ed. Paris, OIE, 1992.
6. ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. *27° Informe del Comité de Expertos de la OMS en Patrones Biológicos*. Ginebra, OMS, 1976. 91p. (OMS. Ser. Inf. Técn., 594).
7. ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. *31° Informe del Comité de Expertos de la OMS en Patrones Biológicos*. Ginebra, OMS, 1981. 332p. (OMS. Ser. Inf. Técn., 658).
8. ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. *Producción, control de calidad y uso de vacunas con adyuvante oleoso contra la fiebre aftosa*. Washington, D.C., OPS/OMS/BID, 1987. 260p.
9. QUIROZ, R., SUTMOLLER, P., BARROETA, M. Factors associated with anaphylactic reactions to chicken embryo foot-and-mouth disease vaccines and Flury rabies vaccines in cattle of Venezuela. *Am. J. Vet. Res.*, 25: 1627-1634, 1964.
10. *The United States Pharmacopeia*. 19. rev. Rockville, MD, United States Pharmacopeial Convention, Inc., 1975.

DETERMINATION OF PYROGENS IN OIL ADJUVANT VACCINES AGAINST FOOT-AND-MOUTH DISEASE

P. M. COTÍAS¹, V.M. VARELA-DÍAZ², H.S. PAIM², J.A. MESQUITA²

¹*Instituto de Hematologia e Reagentes Sta. Catarina*
Rua Pardal Mallet 26, 20270-280 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

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

SUMMARY. *In vivo* and *in vitro* estimates of pyrogenicity were carried out in a series of batches of foot-and-mouth disease (FMD) oil adjuvant vaccines. The findings showed that these immunogens are normally non-reactive in pyrogen assays. Application of these tests is suggested when bacterial contamination of FMD vaccines is suspected and for the characterization of postvaccinal reactions.

Throughout the years, a wide variety of clinical manifestations, sometimes associated with states of hypersensitivity, have been reported sporadically to occur in cattle after administration of foot-and-mouth disease (FMD) vaccines (2,4,9). This consideration suggested that, in certain cases, postvaccinal reactivity could possibly be accounted for in terms of the presence of pyrogens in the respective immunogens. Consequently, the potential inclusion of estimates of pyrogenicity amongst the factors to be analyzed when accounting for the onset of clinical signs following FMD immunizations was contemplated. However, it also followed that the viability of this possibility would depend on the demonstration that these immunogens are normally non-reactive in pyrogen tests.

Currently, pyrogenicity may be assessed both *in vivo* and *in vitro* by means of the rabbit pyrogen test (10) and the *Limulus Amoebocyte Lysate*

(LAL) assay (1,3), respectively. The LAL test is the most sensitive technique for detecting Gram-negative bacterial endotoxin and it may present reactions with as little as 0.0005 µg of endotoxin per ml (5,6) It is also faster, less expensive, and simpler than the pyrogen test in rabbits.

In general, a positive LAL test is regarded as specific for the presence of bacterial endotoxin (1,3). However, a variety of non-lipopolysaccharide compounds, such as ribonuclease, activators of the mammalian blood-coagulation system, poly (I), poly (C) and poly (A), poly (U), also produce positive reactions. It is for this reason that positive results in unknown solutions need to be interpreted with care (1). On the other hand, it has also been established that compounds that are pyrogenic in rabbits may not necessarily be positive by the LAL procedures (1).

MATERIALS AND METHODS

A series of FMD oil adjuvant vaccines were examined to determine if these immunogens are

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

non-reactive in the LAL and rabbit tests for pyrogens. Initially, a randomly selected lot of three FMD oil vaccines, prepared at the Pan American Foot-and-Mouth Disease Center (PAHO/WHO) as described (8), were tested for this purpose. Subsequently, seven other FMD oil vaccine lots, submitted for quality control by commercial producers to animal health authorities in Argentina and Colombia (who kindly provided them for this study), were similarly examined.

To detect pyrogens in these FMD vaccines by LAL, the reagents used were acquired commercially (Whittaker Bioproducts Inc., Walkerville, MD, USA*) and the procedure was carried out as prescribed by the manufacturers. Essentially, the lysate is reconstituted and mixed with equal parts of the vaccine sample. Tubes were incubated undisturbed at 37°C for one hour and examined for gelation by inverting them. Twofold dilutions of endotoxin standard, test vaccine dilutions and the unaltered LAL reagent water were used as controls.

Subsequently, the same lots of vaccines were examined also by the pyrogen test in rabbits, which was carried out essentially as described in the United States Pharmacopeia (10). Thus, all glassware used was previously rendered pyrogen-free by heating at 250°C for 30 minutes, and all vaccines were allowed to warm up to 37°C. Each vaccine was inoculated into a group of three healthy adult New Zealand White rabbits, all of which were of the same sex and approximately 1.5 kg in body weight.

Rabbits were housed individually in special animal quarters free from noise and other disturbances and maintained at a uniform 22-26°C temperature. Food was removed 12 hours prior to performing the tests. However, animals were allowed to have access to water at all times.

Forty minutes prior to injecting test vaccines, rabbits were placed on the holding apparatus and

thermometers were inserted into the rectum to a depth of 7.5 cm or above. None of the rabbits showed temperatures exceeding 39.8°C or below 37.5°C, nor varied in more than 1°C from each other in subsequent serial readings. These conditions would have required discarding the animals, as established by the procedure.

Each animal was inoculated intravenously (marginal ear vein), with 0.5 ml of vaccine per kg of body weight, releasing it slowly so as to administer it completely within a 10-minute period. The specified inoculum was injected into each of three rabbits. Negative control rabbits receiving no vaccine inoculum were tested in parallel.

After inoculation, serial temperature readings were recorded at one-hour intervals, on eight consecutive occasions. Animals were conditioned previously by performing sham trials of the whole procedure except for administration of vaccine, as well as by inoculating them with pyrogen-free saline.

The criterion for establishing the absence of pyrogens consisted in the observation that none of the animals showed a temperature rise of 0.6°C or more above its respective control temperature, and that the sum of the three individual temperature increments was not over 1.4°C. Higher values would be classified as indicating the presence of pyrogens. Animals were also examined clinically after testing to determine possible signs of sensitivity to the inoculum.

It should be mentioned that the procedure also requires that when these conditions are not met, the test should be repeated using five rabbits. If not more than three of them show a temperature rise of 0.6°C or more, or if the sum of the three maximum temperature rises does not exceed 1.4°C, tests are considered apyrogenic.

RESULTS AND DISCUSSION

The results demonstrated that all of the FMD oil adjuvant vaccines tested failed to induce a pyrogenic response in rabbits, or gelation in the LAL assay. These observations indicate the feasi-

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

bility of performing these techniques on vaccine batches associated with postvaccinal reactivity, in order to assist in the latter's characterization. This seems particularly useful in those situations in which immunizations involve partially utilized vaccine bottles which had been kept stored at problem farms, or when suspecting problems with bacterial contaminants during the manufacturing process.

Search of the literature revealed that, in some countries, pyrogen assays are carried out for the quality control of the end-product in antirabies vaccines for human use (7), as well as in human meningococcal polysaccharide vaccines (6). However, we are unaware of pyrogen investigations in FMD or other viral vaccines for veterinary use (5). The justification for their incorporation on a routine basis remains to be demonstrated.

REFERENCES

1. ELIN, R.J., WOLFF, S.M. Nonspecificity of the Limulus Amebocyte Lysate test: positive reactions with polynucleotides and proteins. *J. Infect. Dis.*, 128 (3): 349-352, 1973.
2. FEDIDA, M., DANNACHER, G., BELLI, P., COUDERT, M. Accidents survenus après vaccination anti-aphteuse au cours de la campagne 1984-1985: les cause possibles. *Rec. Méd. Vét.*, 162 (8-9): 947-972, 1986.
3. LEVIN, J., TOMASULO, P.A., OSER, R.S. Detection of endotoxin in human blood and demonstration of an inhibitor. *J. Lab. Clin. Med.*, 75 (6): 903-911, 1970.
4. MUSSGAY, M.W. Accidentes y reacciones de las vacunas contra la fiebre aftosa. En: *III Reunión Interamericana sobre el Control de la Fiebre Aftosa y otras Zoonosis*. Buenos Aires, Argentina, 14-17 de abril de 1970. Washington, D.C., OPS/OMS, 1971. p. 82-87 (Pub. Cien., 218).
5. OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. *Manual of standards for diagnostic tests and vaccines*. 2.ed. Paris, OIE, 1992.
6. ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. *27° Informe del Comité de Expertos de la OMS en Patrones Biológicos*. Ginebra, OMS, 1976. 91p. (OMS. Ser. Inf. Técn., 594).
7. ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. *31° Informe del Comité de Expertos de la OMS en Patrones Biológicos*. Ginebra, OMS, 1981. 332p. (OMS. Ser. Inf. Técn., 658).
8. ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. *Producción, control de calidad y uso de vacunas con adyuvante oleoso contra la fiebre aftosa*. Washington, D.C., OPS/OMS/BID, 1987. 260p.
9. QUIROZ, R., SUTMOLLER, P., BARROETA, M. Factors associated with anaphylactic reactions to chicken embryo foot-and-mouth disease vaccines and Flury rabies vaccines in cattle of Venezuela. *Am. J. Vet. Res.*, 25: 1627-1634, 1964.
10. *The United States Pharmacopeia*. 19. rev. Rockville, MD, United States Pharmacopeial Convention, Inc., 1975.

DETECCIÓN DE SECUENCIAS GENÓMICAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA MEDIANTE LA HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS: UN ENFOQUE PARA EL DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN PERSISTENTE

I.E. BERGMANN, V. MALIRAT, P. AUGÉ DE MELLO, I. GOMES

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

RESUMEN. Se ha desarrollado un ensayo de hibridación capaz de detectar secuencias genómicas del virus de la fiebre aftosa (VFA) en muestras de cultivos de células infectadas o de fluidos esofágico-faríngeos (OP). El ensayo se basa en el uso de una sonda marcada de ADN complementaria a la región que codifica para la polimerasa del VFA. La sonda se obtuvo amplificando en *E. coli* un plásmido conteniendo el fragmento de ADN complementario (cADN) a la región de 6,3 a 7,8 kilobases del genoma del VFA. Debido al alto grado de homología de la secuencia de ácidos nucleicos en esta parte del genoma, fue posible la detección de los tres serotipos sudamericanos en un único ensayo de hibridación. Los resultados positivos obtenidos con muestras de OP de animales experimentalmente infectados extraídas a tiempos tardíos de la infección, durante los cuales la recuperación de virus era principalmente negativa, revelaron el considerable potencial de este método como complemento de los procedimientos convencionales de diagnóstico de infección persistente.

La incidencia de la fiebre aftosa (FA) en los países de América del Sur ha disminuido considerablemente debido a los programas de erradicación en vigencia. Algunas regiones han alcanzado recientemente, o están a punto de obtener, reconocimiento internacional como libres de la enfermedad. Bajo estas circunstancias, son de enorme importancia los ensayos de laboratorio que indiquen en forma confiable la presencia o ausencia del virus en los animales y sus productos. La disponibilidad de técnicas precisas y sensibles es particularmente relevante debido a la habilidad del VFA de producir, además de la enfermedad

aguda, una infección persistente, tanto en animales inmunizados como en no inmunizados (3,7,13,14,27-29).

El diagnóstico de rutina de infección persistente se lleva a cabo por una combinación del aislamiento viral a partir de fluidos esofágico-faríngeos (OP) en una línea de células susceptibles (7,15,25,26) con ensayos serológicos de anticuerpos contra el VFA (1,8,9,16,17,23). Estos procedimientos pueden no rendir siempre resultados conclusivos, en parte debido a que el aislamiento de virus a partir de fluidos OP se torna particularmente intermitente durante las fases tardías de la infección. Ha sido mostrado experimentalmente que pueden ocurrir períodos de hasta 200 días entre dos recuperaciones virales consecutivas (4,12,19).

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

La detección de genomas virales por medio de hibridación de ácidos nucleicos con sondas específicas marcadas (21) representa un enfoque alternativo que en parte puede superar las potenciales limitaciones encontradas en el ensayo de infectividad (5). Con el fin de introducir la hibridación de ácidos nucleicos como una herramienta de diagnóstico de infección subclínica el ADN complementario (cADN) al ARN genómico del VFA O₁ Campos Br 1/58 fue clonado en el plásmido pBR322 para su amplificación (5). El cADN del VFA correspondiente a la región de 6,3 a 7,8 kilobases del genoma viral (que codifica para la polimerasa) marcado radioactivamente se usó como sonda para detectar las secuencias blanco de ARN.

Las muestras de ARN se desnaturalizaron a 60°C durante 15 min en formaldehído al 8,5%, 6x SSC (1x SSC consiste en NaCl 0,15M, y citrato de sodio 0,015M pH 7,0) y se colocaron en la membrana de nylon pre-equilibrada en 6x SSC por medio de un aparato de microfiltración para dot-blot. Los filtros se secaron y se trataron con irradiación UV. La prehibridación se llevó a cabo durante 12 h a 42°C en 4x SSC, 50% formamida deionizada, 5x Denhardt (Ficoll 0,1%, polivinilpirrolidona 0,1% y seroalbúmina bovina 0,1%), fosfato de sodio 40 mM pH 6,5, SDS 0,1% y 250 µg/ml de ADN de esperma de salmón sonicado y desnaturalizado.

El plásmido que contenía el fragmento de cADN de la región que codifica para la polimerasa fue amplificado por crecimiento en *E. coli* y purificado por el método de Birnboim y Dolly (6). El inserto de cADN se separó del vector plasmídico por digestión con Pst I, y se purificó por electroforesis en gel seguida de tratamiento con Gene Clean, como describe el productor (Bio 101 Inc., La Jolla, CA*). La sonda se marcó con ³²P por medio de "nick-translation" usando [α-³²P]dCTP (3000 Ci/mmol, NEN, Boston, MA*), y se purificó por Gene Clean. Se obtuvieron actividades específicas por encima de 10⁸ cpm (Cerenkov)/µg de sonda de ADN.

La hibridación se llevó a cabo con la sonda desnaturalizada a una concentración de 10 ng cADN/ml durante 15 h en bolsas de plástico sellables sumergidas en un baño de agua bajo las mismas

condiciones usadas para la prehibridación. Los filtros se lavaron secuencialmente 2 veces con 2x SSC, SDS 0,1% durante 15 min a temperatura ambiente, 2 veces con 0,1x SSC, SDS 0,1% durante 15 min a 42°C y finalmente en 0,1x SSC, SDS 0,1% durante 15 min a 55°C, hasta que no se detectó más radioactividad en el tampón de lavado.

La especificidad de la sonda para la hibridación se demostró mediante el uso de ARN de células de riñón de cría de hamster (BHK) infectadas y no infectadas con VFA. Esencialmente no se observó reactividad cuando ARN de células BHK no infectadas se hibridó con el fragmento de cADN clonado, marcado con ³²P, que cubría la región que codifica para la polimerasa del VFA. En contraposición se observó significativa reactividad cuando ARN de células BHK infectadas con VFA cepas O₁ Campos Br-1/58, C₃ Resende Br/55 y A₂₄ Cruzeiro Br-1/55 fue hibridado con la sonda de cADN del VFA (figura 1). Este amplio espectro de detección puede explicarse por el alto grado de homología en la secuencia de ácidos nucleicos existente entre los distintos serotipos en la región que codifica para la ARN polimerasa (20). Además, no se detectó reactividad cuando preparaciones de ARN viral previamente tratadas con 100 µg/ml de ARNasa A durante 1 h a 37°C se hibridaron con la sonda de cADN del VFA. Así, una hibridación positiva con cADN de VFA, marcado con ³²P, correspondiente a la región que codifica para la polimerasa a ARN, correlaciona exclusivamente con la presencia de ARN del VFA. Bajo las condiciones usadas para las hibridaciones, el nivel mínimo de detección fue de 2 pg de ARN purificado de VFA (figura 1).

Para evaluar la detección del ARN del VFA en fluidos OP de animales persistentemente infectados en fases tardías, muestras de OP obtenidas a tiempos tardíos de seis animales infectados experimentalmente y de un bovino control no infectado fueron analizadas por hibridación dot-blot. El estado persistente fue indicado por el

* La mención de firmas comerciales o de sus productos es solamente para identificación y no constituye endoso por los autores o sus organizaciones.

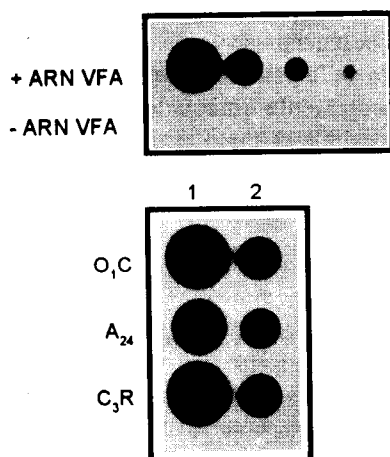


Figura 1. Hibridación por dot-blot del ARN total de células BHK infectadas con la sonda de cADN del VFA clonado y marcado. Las células se infectaron con las cepas de VFA O₁C, Campos Br1/58 (O₁C), A₂₄, Cruzeiro Br1/55 (A₂₄) o C₃R, Resende Br/55 (C₃R) a una multiplicidad de infección de 20 ufp/célula. El ARN total se aisló cuando cerca del 80% de las células exhibían efecto citopático. 1 µg (columna 1) y 0,1 µg (columna 2) fueron aplicados a la membrana de nylon e hibridados con el fragmento de cADN marcado con ³²P correspondiente a la región que codifica para la polimerasa, como se describió en el texto. Las reactividades de referencia (+ARN VFA) consistieron, de izquierda a derecha, de: 2 ng, 200 pg, 20 pg y 2 pg de ARN purificado de VFA, sembrados en presencia de 1 µg de ARN total de células BHK no infectadas. 1 µg de ARN de células BHK no infectadas (-ARN VFA) sirvió como control negativo. La exposición autoradiográfica se realizó durante 18 h a -70°C.

aislamiento ocasional de virus a partir de fluidos OP, así como por la presencia de anticuerpos contra virus replicativo (4,22). Muestras de ARN extraídas de fluidos OP que resultaban negativos por ensayos de infectividad viral a los 532 días posinoculación (DPI), se unieron a una membrana de nylon y se incubaron con la sonda marcada radioactivamente. Como se ve en la figura 2, el procedimiento de dot-blot detectó secuencias virales en los animales 1, 3, 4 y 6, mientras que no se

detectó hibridación para los otros dos animales persistentemente infectados. Estos resultados en los cuales muestras que no rendían virus infectivo resultaban positivas en el ensayo de hibridación por dot-blot confirman observaciones previas (24) y demuestran el valor de este procedimiento en las etapas bien tardías de recuperación de la infección con VFA.

El significado de la detección de secuencias genómicas por dot-blot en muestras que eran negativas por ensayos de infectividad, precisa ser clarificado. Se ha propuesto que el ensayo de dot-

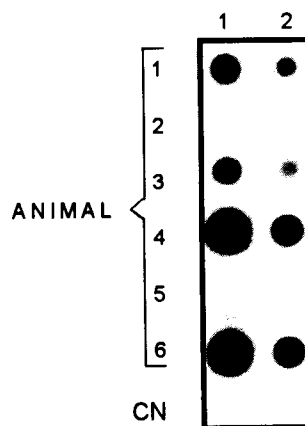


Figura 2. Hibridación por dot-blot del ARN total de fluidos OP con el cADN del VFA marcado. Las infecciones persistentes experimentales con la cepa O₁ Campos Br1/58 fueron establecidas como fuera descripto (4,19). El material de OP fue colectado de los animales experimentalmente infectados por extracción "probang" (27,29). El ARN de OP, aislado usando el método de guanidina/centrifugación en cloruro de cesio (18), fue posteriormente extraído 2 veces con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25-24-1 [vol/vol]) y recuperado por precipitación con etanol. 20 µg (columna 1) y 2 µg (columna 2) del material fueron unidos a la membrana de nylon e hibridados con la sonda de VFA, como se describió en el texto. Las filas 1 a 6 corresponden a ARN total de OP de los diferentes animales infectados. CN, control negativo, consistió de 20 µg (columna 1) y 2 µg (columna 2) de ARN total de OP de un bovino no infectado.

blot podría estar detectando la presencia de mutantes virales no infectivos o de genomas incompletos (24), los cuales, se sabe, ocurren en cultivos de células persistentemente infectados (10). Alternativamente, los ensayos de infectividad podrían estar fallando en detectar la presencia de virus replicativo en algunos de los fluidos OP por razones que no son claras. En todos los animales estudiados pudo recuperarse virus infectivo en algunas muestras OP obtenidas a tiempos más tardíos que el muestreo tomado a los 532 DPI. Así la hibridación molecular resulta útil como un ensayo complementario para detectar un riesgo potencial con VFA infectivo, particularmente en el caso de la persistencia tardía, cuando el aislamiento de virus a partir de fluidos OP es poco frecuente.

Debe ser notado, sin embargo, que los animales 2 y 5, que eran negativos por dot-blot a los 532 DPI, también revelaron virus infectivo a tiempos más tardíos. Esto sugiere que en algunos casos el virus está presente en muy pequeñas cantidades y/o que lo que se está observando representa una presencia temporaria del virus en la región OP. Solo se dispone de información limitada acerca del mecanismo de replicación del virus en la región OP y/o de su excreción, así como de la localización del virus en el animal durante la persistencia (2,11,30). La hibridación de ácidos nucleicos con o sin previa amplificación de la muestra por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) está siendo aplicada en el presente como una herramienta sensible para estudiar el mantenimiento del ARN del VFA en la región OP y/o su presencia potencial en otros tejidos y fluidos. Resultados preliminares indicaron la presencia de secuencias genómicas virales en las células blancas de la sangre, así como en otros tejidos de animales persistentemente infectados (manuscrito en preparación).

Una mayor aplicación de esta técnica se requiere para evaluar el significado de un ensayo de hibridación. Hasta contar con más información, un resultado de hibridación positivo inicialmente debería acarrear la connotación de que el animal ha sido expuesto al VFA, aun cuando no se puede determinar si el ácido nucleico reaccionante es infectivo o si está presente en niveles suficientes

para representar un potencial riesgo epidemiológico. Se debe tener presente que la evidencia disponible acerca de la potencial transmisión del animal persistentemente infectado hacia un hospedador susceptible es tanto limitada cuanto circunstancial.

REFERENCIAS

1. ALONSO FERNANDEZ, A., AUGÉ DE MELLO, P., GOMES, I., ROSENBERG, F. El uso del antígeno asociado a la infección viral (VIA) en la detección de ganado expuesto al virus de la fiebre aftosa. /The use of virus-infection-associated antigen (VIA) in the detection of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 17-18:17-22, 1975.
2. AUGÉ DE MELLO, P., HONIGMAN, M.N., FERNANDES, V. Supervivencia en bovinos del virus modificado de la fiebre aftosa. *Bull. Off. Int. Epizoot.*, 65:2091-2106, 1966.
3. AUGÉ DE MELLO, P., HONIGMAN, M.N., FERNANDES, M.V., GOMES, I. Further information on the survival of modified foot-and-mouth disease virus in cattle. *Bull. Off. Int. Epizoot.*, 73:489-505, 1970.
4. BERGMANN, I.E., AUGÉ DE MELLO, P., NETZERT, E., BECK, E., GOMES, I. Diagnosis of persistent aphthovirus infection and its differentiation from vaccination response in cattle by use of enzyme-linked immunoelectrotransfer blot analysis with bioengineered nonstructural viral antigens. *Am. J. Vet. Res.*, 54 (6):825-831, 1993.
5. BERGMANN, I.E., MALIRAT, V. Enfoques moleculares para el diagnóstico en laboratorio de la infección persistente con el virus de la fiebre aftosa. /Molecular approaches to laboratory diagnosis of persistent foot-and-mouth disease virus infection. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 59:153-177, 1993.
6. BIRNBOIM, H.C. DOLLY, J.A. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, 7:1513-1518, 1979.
7. BURROWS, R. Studies on the carrier state of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus. *J. Hyg.*, 64:81-90, 1966.
8. COWAN, K.M., GRAVES, J.H. A third antigenic component associated with FMD infection. *Virology*, 30:528-540, 1966.

9. DAWE, P.S., PINTO, A.A. Antibody response to type specific and "virus infection associated" (VIA) antigens in cattle vaccinated with inactivated polyvalent FMD virus in Northern Malawi. *Br. Vet. J.*, 134:504-511, 1978.
10. DE LA TORRE, J.C., DAVILA, M., SOBRINO, F., ORTIN, J., DOMINGO, E. Establishment of cell lines persistently infected with foot-and-mouth disease virus. *Virology*, 145:24-35, 1985.
11. EPIFANOV, G.F., SHALASHOV, L.V. Duration of retention of virus in the blood of animals which have recovered from foot-and-mouth disease. *Veterinariya, Moscow*, 3:34-35, 1968.
12. GEBAUER, F., DE LA TORRE, J.C., GOMES, I., MATEU, M.G., BARAHONA, H., TIRABOSCHI, B., BERGMANN, I., AUGÉ DE MELLO, P., DOMINGO, E. Rapid selection of genetic and antigenic variants of foot-and-mouth disease virus during persistence in cattle. *J. Virol.*, 62:2041-2049, 1988.
13. HEDGER, R.S. The isolation and characterization of foot-and-mouth disease virus from clinically normal herds of cattle in Botswana. *J. Hyg.*, 66:27-36, 1968.
14. KAADEN, O.R., EISSNER, G., BÖHM, H.O. Untersuchungen über Maul- und Klauenseuche (MKS)-Virusdauer ausscheider bei vakzinierten und experimentell infizierten Rindern. *Zbl. Vet. Med. B.*, 17:485-496, 1970.
15. LEEUW, P.W., VAN BEKKUM, J.G., TIESSINK, J.W.A. Excretion of foot-and-mouth disease virus in esophageal-pharyngeal fluid and milk of cattle after intranasal infection. *J. Hyg.*, 81:415, 1978.
16. LOBO, C.A., HANSON, R.P., GUTIÉRREZ, A., BELTRAN, L.E. Serological detection of natural FMD infection in cattle and pigs. *Bull. Off. Int. Epizoot.*, 85:1075-1104, 1976.
17. McVICAR, J.W., SUTMÖLLER, P. FMD: The agar gel diffusion precipitin test for antibody to virus-infection associated (VIA) antigen as a tool for epizootologic surveys. *Am. J. Epidemiol.*, 92:273-278, 1970.
18. MacDONALD, R.J., SWIFT, G.H., PRZYBYLA, A.E., CHIRGWIN, J.M. Isolation of RNA using guanidinium salts. *Methods in Enzymology*, 152:224-227, 1987.
19. MALIRAT, V., AUGÉ DE MELLO, P., TIRABOSCHI, B., BECK, E., GOMES, I., BERGMANN, I.E. Genetic variation of foot-and-mouth disease virus during persistent infection in cattle. *Virus Research*, 34:31-48, 1994.
20. MARTINEZ-SALAS, E.; ORTIN, J., DOMINGO, E. Sequence of the viral replicase gene from foot-and-mouth disease virus C1-Santa Pau (C-S8). *Gene*, 35:55-61, 1985.
21. MEINKOTH, J., WALL, G. Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal. Biochem.*, 138:267-284, 1984.
22. NETZERT, E., BECK, E., AUGÉ DE MELLO, P., GOMES, I., BERGMANN, I.E. 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. *Virology*, 184:799-804, 1991.
23. PINTO, A.A., GARLAND, A.J.M. Immune response to virus-infection-associated (VIA) antigen in cattle repeatedly vaccinated with foot-and-mouth disease virus inactivated by formalin or acetylenimine. *J. Hyg.*, 82:41-50, 1979.
24. ROSSI, M.S., SADIR, A.M., SCHUDEL, A.A., PALMA, E.L. Detection of foot-and-mouth disease virus with DNA probes in bovine esophageal-pharyngeal fluids. *Arch. Virol.*, 99:67-74, 1988.
25. STRAVER, P.J., VAN BEKKUM, J.G. Plaque production by carrier strains of foot-and-mouth disease virus in BHK monolayers incubated at different temperatures. *Arch. Ges. Virusforsch.*, 37:12-18, 1972.
26. SUTMÖLLER, P., COTTRAL, G.E. Improved techniques for the detection of FMDV in carrier cattle. *Arch. Ges. Virusforsch.*, 21 (2):170-177, 1967.
27. SUTMÖLLER, P., GAGGERO, A. Foot-and-mouth disease carriers. *Vet. Rec.*, 77:968-969, 1965.
28. SUTMÖLLER, P., McVICAR, J.W., COTTRAL, G.E. The epizootiological importance of foot-and-mouth disease carriers. I. Experimentally produced foot-and-mouth disease carriers in susceptible and immune cattle. *Arch. Ges. Virusforsch.*, 23:227-235, 1968.
29. VAN BEKKUM, J.G., FRENKEL, H.S., FREDERIKS, H.H.J., FRENKEL, S. Observation on the carrier state of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus. *Tijdschr. Diergeneesk.*, 84:1159-1164, 19359.
30. WALDMANN, O., TRAUTWEIN, K., PYL, F. Die persistenz des maul und klauenaeuche virus im korper durch geseuchter tiere und seine ausecheidung. *Zentralblattf. Bakt. Par. U. Infekkr.*, 121:19-32, 1931.

DETECTION OF FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRAL GENOMIC SEQUENCES BY NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION: AN APPROACH TO THE DIAGNOSIS OF PERSISTENT INFECTION

I.E. BERGMANN, V. MALIRAT, P. AUGÉ DE MELLO, I. GOMES

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

SUMMARY. A standardized hybridization assay was developed, capable of detecting foot-and-mouth disease viral (FMDV) genomic sequences in samples from infected cell cultures or oesophageal pharyngeal (OP) fluids. The assay is based on the use of a labeled DNA probe complementary to the FMDV polymerase coding region. The probe was obtained by amplifying in *E. coli* a plasmid containing the complementary DNA (cDNA) fragment corresponding to the region from 6.3 to 7.8 kilobases of the FMDV genome. Because of the high degree of nucleic acid sequence homology in this part of the genome, detection of the three South American serotypes was possible in a single hybridization assay. The considerable potential of this method as an adjunct to conventional procedures for diagnosis of persistent infection was revealed by the positive results obtained with OP fluid samples from experimentally infected cattle at late stages of the infection, during which virus recovery was mainly negative.

The incidence of foot-and-mouth disease (FMD) in South American countries has decreased considerably due to the ongoing eradication programs. Some regions have recently reached, or are about to attain, international recognition as disease-free. Under such circumstances, laboratory tests which reliably indicate the presence or absence of virus in livestock are of utmost importance. The availability of accurate and sensitive techniques is particularly relevant because of the ability of FMDV to produce, in addition to the acute disease, a persistent infection both in nonimmunized and in immunized animals (3, 7, 13, 14, 27-29).

Routine diagnosis of persistent infection is carried out by a combination of virus isolation from oesophageal-pharyngeal (OP) fluids in a susceptible cell line (7, 15, 25, 26) and serological testing for antibodies against FMDV (1, 8, 9, 16, 17, 23). These procedures may not always give conclusive results, partly because virus isolation from OP fluids becomes particularly intermitent during the late phases of the infection. It has been shown experimentally that periods of up to 200 days may occur between two consecutive viral recoveries (4, 12, 19).

Detection of viral genomes by nucleic acid hybridization with specific labeled probes (21) represents an alternative approach that may partially overcome potential limitations encountered by the infectivity assay (5). In order to introduce nucleic acid hybridization as a diagnostic tool in

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

suspected subclinical infections the complementary DNA (cDNA) to the genomic RNA of FMDV O₁ Campos Br 1/58 was cloned into the plasmid pBR322 for amplification (5). Radioactively labeled cloned FMDV cDNA corresponding to the region from 6.3 to 7.8 kilobases of the viral genome (polymerase coding region) was used as a probe to detect the target RNA sequences.

RNA samples were denatured at 60°C for 15 min in 8.5% formaldehyde, 6x SSC (1x SSC is 0.15 M NaCl plus 0.015 M sodium citrate pH 7.0), and dotted onto nylon membranes pre-equilibrated in 6x SSC, by means of a dot-blot microfiltration apparatus. The filters were blotted dry and cross-linked by UV irradiation. Prehybridization was carried out for 12 h at 42°C in 4x SSC, 50% deionized formamide, 5x Denhardt (0.1% Ficoll, 0.1% polyvinylpyrrolidone and 0.1% bovine serum albumin), 40mM sodium phosphate pH 6.5, 0.1% SDS and 250 µg/ml of sonicated denatured salmon sperm DNA.

The plasmid containing the cDNA fragment from the polymerase coding region was amplified by growth in *E. coli* and purified by the Birnboim and Dolly method (6). The cDNA insert was excised from the plasmid vector by digestion with Pst I, and purified by gel electrophoresis followed by Gene Clean as described by the manufacturer (Bio 101 Inc., La Jolla, CA*). The probe was labeled with ³²P by nick-translation using [α -³²P] dCTP (3000 Ci/mmol, NEN, Boston, MA*), and purified by Gene Clean. Specific activities of over 10⁸ cpm (Cerenkov)/µg of probe DNA were obtained.

Hybridization was performed with the denatured probe at 10 ng cDNA/ml for 15 h in heat-sealable plastic bags immersed in a water bath under the same conditions used for prehybridization. Filters were rinsed sequentially in 2 washes of 2x SSC, 0.1% SDS for 15 min at room temperature, 2 washes in 0.1x SSC, 0.1% SDS for 15 min at 42°C, and finally in 0.1x SSC, 0.1%

SDS for 15 min at 55°C, until no further radioactivity was detected in the wash buffer.

Specificity of the probe for hybridization was shown by use of RNA from uninfected and FMDV-infected baby hamster kidney (BHK) cells. Essentially no reactivity was exhibited when RNA from uninfected BHK cells was probed with the cloned ³²P-labeled cDNA fragment that spanned the FMDV polymerase coding region. In contrast, significant reactivity was observed when RNA from BHK cells infected with FMDV strains O₁ Campos Br-1/58, C₃ Resende Br/55 or A₂₄ Cruzeiro Br-1/55 was hybridized with the FMDV cDNA probe (figure 1).

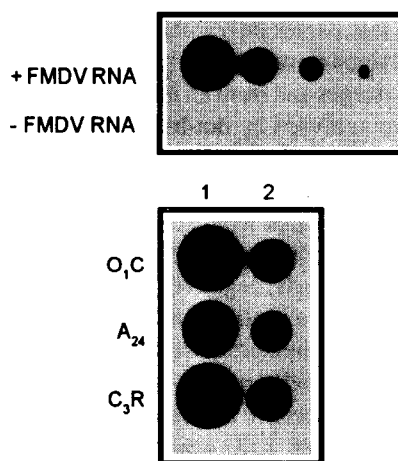


Figure 1. Dot-blot hybridization of labeled cloned FMDV cDNA to total RNA from BHK-infected cells. Cells were infected with FMDV strains O₁ Campos Br 1/58 (O₁C), A₂₄ Cruzeiro Br 1/55 (A₂₄) or C₃ Resende BR/55 (C₃R) at a moi of 20 pfu/cell. Total RNA was isolated when about 80% of the cells exhibited cytopathic effect. 1 µg (column 1) and 0.1 µg (column 2) were applied to a nylon membrane and hybridized with the ³²P-labeled cDNA fragment corresponding to the polymerase coding region as described in the text. Reference dots (+FMDV RNA) consisted, from left to right, of 2 ng, 200 pg, 20 pg and 2 pg of purified FMDV RNA strain O₁C, loaded in the presence of 1 µg of total uninfected BHK cell RNA. 1 µg of uninfected BHK cell RNA (-FMDV RNA) served as a negative control. Autoradiographic exposure was at -70°C for 18 h.

* Mention in this paper of commercial firms or their products is for identification only and does not constitute endorsement by the authors or their organizations.

This broad detection spectrum can be explained by the high degree of nucleic acid sequence homology shared among the different serotypes in the RNA polymerase coding region (20). Moreover, no labeling was detected when viral RNA preparations, previously treated with RNase A at 100 µg/ml for 1h at 37°C were hybridized with the FMDV cDNA probe. Thus, a positive hybridization with ³²P-labeled FMDV cDNA corresponding to the region coding for the RNA polymerase, correlates exclusively with the presence of FMDV RNA. Under the conditions used in the hybridizations, the minimum level of detection was 2 pg of purified FMDV RNA (figure 1).

To evaluate detection of FMDV RNA in OP fluids from late persistently infected animals, OP samples obtained from six experimentally infected cattle at late stages and from an uninfected control animal were analyzed by dot-blot hybridization. The persistent status was indicated by occasional isolation of virus from OP fluids, as well as by the presence of antibodies against replicating virus (4,22). RNA samples extracted from OP fluids which were found to be negative by virus infectivity tests at 532 days postinoculation (DPI), were dotted on a nylon membrane and incubated with the radioactively labeled probe. As shown in figure 2, the dot-blot procedure detected viral RNA sequences in animals 1, 3, 4 and 6, whereas no hybridization was found for the other two persistently infected cattle. These results, in which samples did not yield infectious virus, but were positive in the dot-blot hybridization assay, confirm previous observations (24), and demonstrate the value of the procedure in the very late stages of recovery from FMD infection.

The implication of detection of genomic sequences by dot-blot in samples that were negative by infectivity assays needs to be clarified. It has been proposed that the dot-blot test could be detecting the presence of non-infectious viral mutants or incomplete genomes (24), which are known to occur in persistently infected cell cultures (10). Alternatively, infectivity assays may be failing to detect replicating virus in some of the OP fluids, for reasons which are not clear. In all the animals studied, infective virus could be recovered from

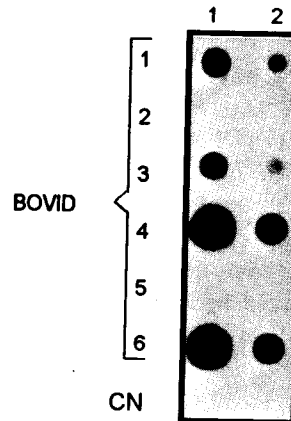


Figure 2. Dot-blot hybridization of total RNA from OP fluids to labeled cloned FMDV cDNA. The experimental persistent infections with strain O₁ Campos Br-1/58 were established as described (4,19). OP material was collected by probang extraction (27,29). The OP RNA isolated using the guanidinium/cesium chloride centrifugation method (18) was then extracted twice with phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25-24-1 [vol/vol]), and recovered by ethanol precipitation. 20 µg (column 1) and 2 µg (column 2) of the material were dotted onto a nylon membrane and hybridized to the FMDV probe as described in the text. Rows 1 to 6 correspond to total OP RNA from the different infected animals. NC, negative control, consisted of 20 µg (column 1) and 2 µg (column 2) of total OP RNA from an uninfected animal.

some OP samples obtained after the sampling taken at 532 DPI. Therefore it seems that molecular hybridization is useful as a complementary test to detect a potential risk with infective FMDV, particularly in the case of late persistence when virus isolation from OP fluids is infrequent.

It should be noted, however, that animals 2 and 5, which were dot-blot negative at 532 DPI, also revealed infective virus later on. This suggests that in some cases, the virus is present in very small quantities, and/or that what is being observed represents a temporary presence of the virus in the oropharynx. Only limited information is available

on the mechanism of virus replication in the OP region and/or its excretion, as well as on the location of the virus in the animal during persistence (2,11,30). Nucleic acid hybridization, with or without prior amplification of the sample by the polymerase chain reaction (PCR) method, is presently being used as a sensitive tool to study the maintenance of FMDV RNA in the OP region, and/or its potential presence in other tissues and fluids. Preliminary results indicated the presence of viral genomic sequences in white blood cells as well as in other tissues of persistently infected animals (manuscript in preparation).

Further application of this technique is required to evaluate the significance of a hybridization test. Until more information is known, an initial positive hybridization result should carry the connotation that the animal has been exposed to FMDV, even though it cannot be determined whether the reacting nucleic acid is infectious or present in sufficient levels to represent a potential epidemiological hazard. It should be born in mind that the evidence available on the potential transmission from a persistently infected animal to a susceptible host, is both limited and circumstantial.

REFERENCES

- ALONSO FERNANDEZ, A., AUGÉ DE MELLO, P., GOMES, I., ROSENBERG, F. El uso del antígeno asociado a la infección viral (VIA) en la detección de ganado expuesto al virus de la fiebre aftosa./The use of virus-infection-associated antigen (VIA) in the detection of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 17-18:17-22, 1975.
- AUGÉ DE MELLO, P., HONIGMAN, M.N., FERNANDES, V. Supervivencia en bovinos del virus modificado de la fiebre aftosa. *Bull. Off. Int. Epizoot.*, 65:2091-2106, 1966.
- AUGÉ DE MELLO, P., HONIGMAN, M.N., FERNANDES, M.V., GOMES, I. Further information on the survival of modified foot-and-mouth disease virus in cattle. *Bull. Off. Int. Epizoot.*, 73:489-505, 1970.
- BERGMANN, I.E., AUGÉ DE MELLO, P., NEITZERT, E., BECK, E., GOMES, I. Diagnosis of persistent aphthovirus infection and its differentiation from vaccination response in cattle by use of enzyme-linked immunoelectrotransfer blot analysis with bioengineered nonstructural viral antigens. *Am. J. Vet. Res.*, 54 (6):825-831, 1993.
- BERGMANN, I.E., MALIRAT, V. Enfoques moleculares para el diagnóstico en laboratorio de la infección persistente con el virus de la fiebre aftosa./Molecular approaches to laboratory diagnosis of persistent foot-and-mouth disease virus infection. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 59:153-177, 1993.
- BIRNBOIM, H.C. DOLLY, J.A. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, 7:1513-1518, 1979.
- BURROWS, R. Studies on the carrier state of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus. *J. Hyg.*, 64:81-90, 1966.
- COWAN, K.M., GRAVES, J.H. A third antigenic component associated with FMD infection. *Virology*, 30:528-540, 1966.
- DAWE, P.S., PINTO, A.A. Antibody response to type specific and "virus infection associated" (VIA) antigens in cattle vaccinated with inactivated polyvalent FMD virus in Northern Malawi. *Br. Vet. J.*, 134:504-511, 1978.
- DE LA TORRE, J.C., DAVILA, M., SOBRINO, F., ORTIN, J., DOMINGO, E. Establishment of cell lines persistently infected with foot-and-mouth disease virus. *Virology*, 145:24-35, 1985.
- EPIFANOV, G.F., SHALASHOV, L.V. Duration of retention of virus in the blood of animals which have recovered from foot-and-mouth disease. *Veterinariya, Moscow*, 3:34-35, 1968.
- GEBAUER, F., DE LA TORRE, J.C., GOMES, I., MATEU, M.G., BARAHONA, H., TIRABOSCHI, B., BERGMANN, I., AUGÉ DE MELLO, P., DOMINGO, E. Rapid selection of genetic and antigenic variants of foot-and-mouth disease virus during persistence in cattle. *J. Virol.*, 62:2041-2049, 1988.
- HEDGER, R.S. The isolation and characterization of foot-and-mouth disease virus from clinically normal herds of cattle in Botswana. *J. Hyg.*, 66:27-36, 1968.
- KAADEN, O.R., EISSLER, G., BÖHM, H.O. Untersuchungen über Maul- und Klauenseuche (MKS)-Virusdauer ausscheider bei vakzinierten

- und experimentell infizierten Rindern. *Zbl. Vet. Med. B.*, 17:485-496, 1970.
15. LEEUW, P.W., VANBEKKUM, J.G., TIESSINK, J.W.A. Excretion of foot-and-mouth disease virus in esophageal-pharyngeal fluid and milk of cattle after intranasal infection. *J. Hyg.*, 81:415, 1978.
 16. LOBO, C.A., HANSON, R.P., GUTIÉRREZ, A., BELTRAN, L.E. Serological detection of natural FMD infection in cattle and pigs. *Bull. Off. Int. Epizoot.*, 85:1075-1104, 1976.
 17. McVICAR, J.W., SUTMÖLLER, P. FMD: The agar gel diffusion precipitin test for antibody to virus-infection associated (VIA) antigen as a tool for epizootiologic surveys. *Am. J. Epidemiol.*, 92:273-278, 1970.
 18. MacDONALD, R.J., SWIFT, G.H., PRZYBYLA, A.E., CHIRGWIN, J.M. Isolation of RNA using guanidinium salts. *Methods in Enzymology*, 152:224-227, 1987.
 19. MALIRAT, V., AUGÉ DE MELLO, P., TIRABOSCHI, B., BECK, E., GOMES, I., BERGMANN, I.E. Genetic variation of foot-and-mouth disease virus during persistent infection in cattle. *Virus Research*, 34:31-48, 1994.
 20. MARTINEZ-SALAS, E., ORTIN, J., DOMINGO, E. Sequence of the viral replicase gene from foot-and-mouth disease virus C1-Santa Pau (C-S8). *Gene*, 35:55-61, 1985.
 21. MEINKOTH, J., WALL, G. Hybridization of nucleic acids immunobilized on solid supports. *Anal. Biochem.*, 138:267-284, 1984.
 22. NEITZERT, E., BECK, E., AUGÉ DE MELLO, P., GOMES, I., BERGMANN, I.E. 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. *Virology*, 184:799-804, 1991.
 23. PINTO, A.A., GARLAND, A.J.M. Immune response to virus-infection-associated (VIA) antigen in cattle repeatedly vaccinated with foot-and-mouth disease virus inactivated by formalin or acetylenimine. *J. Hyg.*, 82:41-50, 1979.
 24. ROSSI, M.S., SADIR, A.M., SCHUDEL, A.A., PALMA, E.L. Detection of foot-and-mouth disease virus with DNA probes in bovine esophageal-pharyngeal fluids. *Arch. Virol.*, 99:67-74, 1988.
 25. STRAVER, P.J., VAN BEKKUM, J.G. Plaque production by carrier strains of foot-and-mouth disease virus in BHK monolayers incubated at different temperatures. *Arch. Ges. Virusforsch.*, 37:12-18, 1972.
 26. SUTMÖLLER, P., COTTRAL, G.E. Improved techniques for the detection of FMDV in carrier cattle. *Arch. Ges. Virusforsch.*, 21 (2):170-177, 1967.
 27. SUTMÖLLER, P., GAGGERO, A. Foot-and-mouth disease carriers. *Vet. Rec.*, 77:968-969, 1965.
 28. SUTMÖLLER, P., McVICAR, J.W., COTTRAL, G.E. The epizootiological importance of foot-and-mouth disease carriers. I. Experimentally produced foot-and-mouth disease carriers in susceptible and immune cattle. *Arch. Ges. Virusforsch.*, 23:227-235, 1968.
 29. VAN BEKKUM, J.G., FRENKEL, H.S., FREDERIKS, H.H.J., FRENKEL, S. Observation on the carrier state of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus. *Tijdschr. Diergeneesk.*, 84:1159-1164, 19359.
 30. WALDMANN, O., TRAUTWEIN, K., PYL, F. Die persistenz des Maul und klauenaeuche virus im korper durch geseuchter tiere und seine ausecheidung. *Zentralblattf. Bakt. Par. U. Infekkr.*, 121:19-32, 1931.

CARACTERIZACIÓN SEROLÓGICA Y MOLECULAR DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA, SEROTIPO O, AISLADAS A PARTIR DE BROTES OCURRIDOS ENTRE 1958 Y 1983 EN BRASIL Y ARGENTINA

V. MALIRAT, I.E. BERGMANN, A. ALONSO, P.J.V. PEREIRA, M.A.A. BOLLER

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

RESUMEN. La caracterización genética de cepas del virus de la fiebre aftosa representativas de brotes importantes del serotipo O, ocurridos entre 1958 y 1983 en el sudeste de Brasil y el centro-este de Argentina, fue obtenida usando mapas de oligonucleótidos resistentes a T₁. Los resultados obtenidos constituyen la base de un banco de datos para ser aplicado en estudios epidemiológicos.

El control de la fiebre aftosa (FA) en regiones endémicas se ve comprometido por la considerable variabilidad de este virus (16), la cual es responsable por su compleja serología. Existen siete tipos inmunológicamente diferentes del VFA: O, A, C, SAT-1, SAT-2, SAT-3 y Asia-1 (22), cada uno de los cuales comprende un número siempre en aumento de subtipos (21,24).

En América del Sur, la vigilancia continua de la situación en el campo para detectar el surgimiento de nuevas variantes, se encuentra limitada básicamente a los ensayos serológicos clásicos (3). Debido a que estos métodos no proporcionan datos definitivos acerca de las relaciones entre cepas de brotes individuales, las fuentes a partir de las cuales se está diseminando la infección pueden ser difíciles de identificar. Dicha información se torna más relevante en vista del éxito de los programas

de erradicación vigentes en los países sudamericanos.

En contraposición a los ensayos serológicos, las técnicas moleculares tales como el *fingerprinting* de oligonucleótidos resistentes a ARNasa T₁ (10,14) o el secuenciamiento rápido (23), que analizan la estructura genética primaria del virus, permiten una medida más precisa del grado de relación entre cepas virales, constituyéndose en una valiosa herramienta epidemiológica para seguir el comportamiento de las cepas en el campo.

El análisis por *fingerprinting* ha sido especialmente útil para estudiar relaciones evolutivas entre cepas semejantes (12,13,15,18,25). Inclusive, su aplicación diagnóstica ha sido claramente demostrada para el VFA. De hecho, ha sido utilizado para determinar que existen relaciones cercanas entre la mayoría de las cepas europeas de campo y las vacunales (11,17).

Para las cepas sudamericanas, se han registrado los mapas T₁ de los virus prototipo usados actualmente en la producción de vacunas (5,9), y por medio de ellos se ha establecido

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

heterogeneidad dentro de una de estas cepas (26). También fueron registrados mapas T_1 de virus subtipo C_3 aislados en Argentina entre 1981 y 1986 (7). El presente informe extiende este análisis a varias cepas de brotes de campo relevantes del serotipo O que ocurrieron entre 1958 y 1983 en Argentina y Brasil.

Las cepas virales, obtenidas de la colección del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, fueron pasadas en cultivos en monocapa de células de riñón de cría de hamster, el número mínimo de veces necesario para proveer ARN suficiente para los análisis. En la mayoría de los casos esto involucró tres o cuatro pasajes a partir del material de campo, sin previo clonado por plaqueo. La preparación del ARN marcado con ^{32}P a partir del citoplasma de células infectadas se llevó a cabo como fue descrito anteriormente (5). 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 (8).

Fueron estudiados seis aislamientos representativos de diferentes episodios ocurridos durante un período de veinticinco años, en el sudeste de Brasil y el centro-este de Argentina. Estos fueron obtenidos de animales infectados en las localidades y fechas indicadas en el cuadro 1. Las comparaciones serológicas de estas muestras entre sí establecieron un amplio espectro de relaciones que no eran proporcionales al tiempo transcurrido entre los aislamientos (figura 1). Esto se ve en la relativa similitud del virus $O_1 C/58$ con el $O_1 Arg/77$ y el $O_1 Iri/83$ aislados con 19 y 25 años de diferencia, respectivamente, y la marcada diferencia entre las cepas $O_1 Cas/67$ y $O_1 Br/70$, recuperadas con tres años de diferencia.

En la figura 2 se presentan los *fingerprints* de los ARNs de estos seis virus. La figura 3 muestra una representación esquemática de las diferencias entre cada uno de ellos y la cepa temprana $O_1 C/58$. Estas comparaciones revelaron padrones que diferían en varias manchas, excepto para el virus

Cuadro 1. Cepas representativas del VFA, aisladas en Argentina y Brasil entre 1958 y 1983

Cepa	Origen Localidad, Provincia, País	Fecha de aislamiento (Mes/Año)
$O_1 C/58$	Campos, Rio de Janeiro, Brasil	01/1958
$O_1 Cas/67$	Caseros, Buenos Aires, Argentina	01/1967
$O_1 Br/70$	Bagé, Rio Grande do Sul, Brasil	09/1970
$O_1 Arg/77$	No registrado, Argentina	11/1977
$O_1 Br/80$	Dom Pedrito, Rio Grande do Sul, Brasil	06/1980
$O_1 Iri/83$	Hipólito Irigoyen, Buenos Aires, Argentina	09/1983

Abreviaciones:

$O_1 C/58$, O_1 Campos Br 1/58; $O_1 Cas/67$, O_1 Caseros-Arg 2/67; $O_1 Br/70$, O_1 RS Brasil/70; $O_1 Arg/77$, O_1 Argentina/77; $O_1 Br/80$, O_1 RS Brasil/80; $O_1 Iri/83$, O_1 Irigoyen Argentina/83.

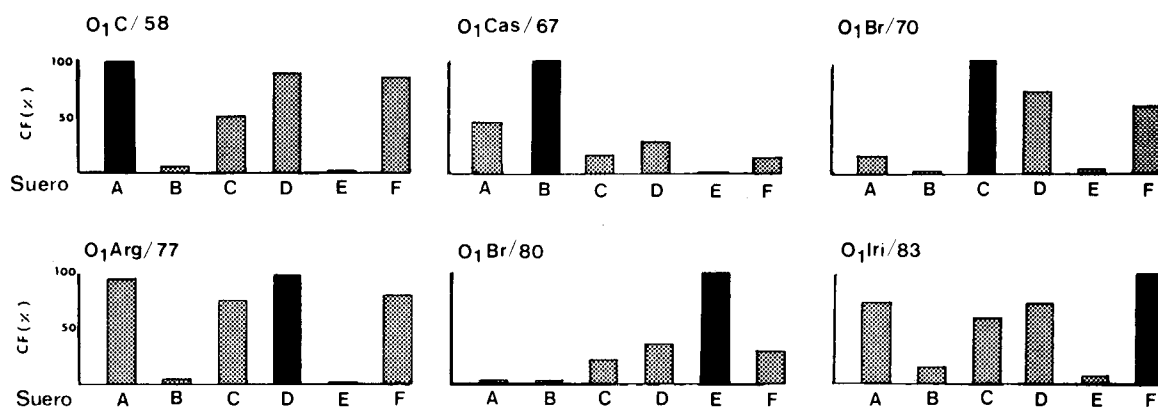


Figura 1. Análisis serológico de los virus indicados. Las relaciones serológicas se estudiaron por ensayo de fijación del complemento al 50% de hemólisis (CF) con los siguientes sueros: A, O₁ C/58; B, O₁ Cas/67; C, O₁ Br/70; D, O₁ Arg/77; E, O₁ Br/80; F, O₁ Iri/83

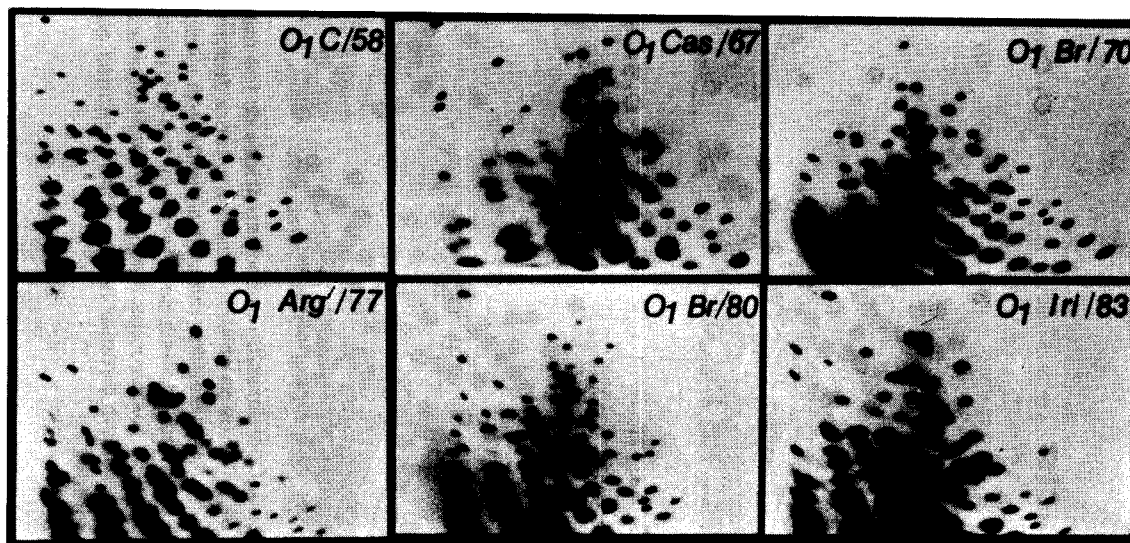


Figura 2. Mapas bidimensionales de oligonucleótidos resistentes a ARNasa T₁ del ARN marcado con ³²P de las cepas correspondientes

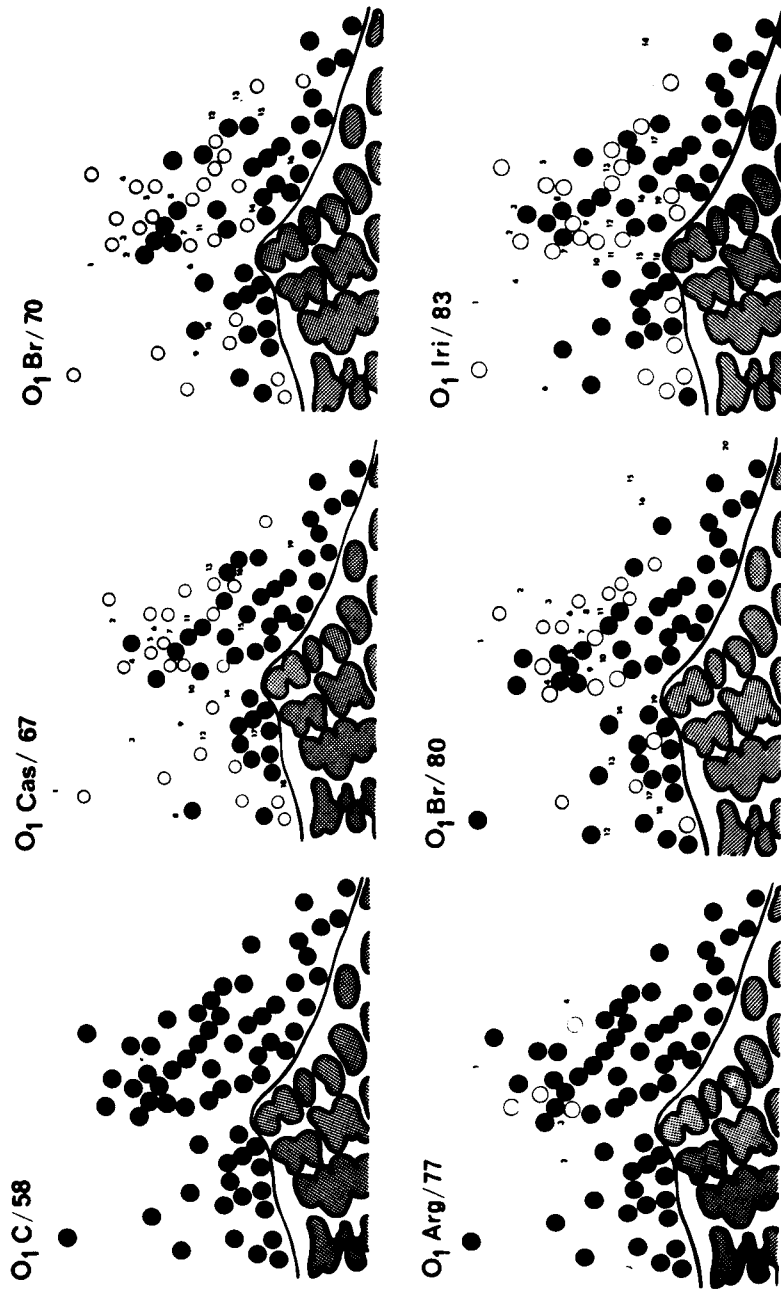


Figura 3. Comparaciones esquemáticas de los mapas T_1 de las cepas indicadas, respecto de la cepa temprana $O_1 C/58$. Los criterios de análisis son como fuera descripto (18). Las diferencias se determinaron comparando la migración de los oligonucleótidos individualmente y en mezclas conteniendo cantidades equivalentes de ambos digestos de T_1 . Simbología del análisis comparativo: los círculos llenos corresponden a oligonucleótidos comunes a ambas cepas comparadas, los círculos vacíos representan manchas del virus $O_1 C/58$ ausentes en el aislado de campo comparado; los números sin circular representan manchas ausentes en la cepa temprana $O_1 C/58$ pero presentes en la muestra comparada

O₁ Arg/77, que mostró un mapa T₁ bastante similar al de la cepa temprana, con solamente cuatro manchas adicionales y cuatro faltantes. Los valores deducidos a partir de la figura 3, calculados como se informó previamente (20), indicaron que la homología genética fue siempre mayor al 96% (O₁ Cas/67, 96,2%; O₁ Br/70, 96%; O₁ Arg/77, 99,3%; O₁ Br/80, 96,5% y O₁ Iri/83, 96,2%), que cae dentro del intervalo esperado en el cual es posible comparar las variaciones de los mapas T₁ de diferentes ARNs (1).

Así como se observó con los datos serológicos, el grado de variación no fue proporcional al tiempo transcurrido entre aislamientos. Inclusive, no parece haber acumulación de oligonucleótidos variantes en aislamientos consecutivos. Los resultados de la secuencia de nucleótidos permitieron extraer conclusiones semejantes (18).

Estos padrones de variación sugieren que los aislamientos de campo podrían representar fluctuaciones de poblaciones heterogéneas, con una gama de relaciones que van desde cercanas hasta distantes de la secuencia consenso. Estas poblaciones podrían evolucionar independientemente unas de otras y serían seleccionadas bajo ciertas condiciones epidemiológicas. En el caso del virus O₁ Arg/77, una explicación alternativa también podría ser la reintroducción accidental de virus vacunales en el campo, como ha sido sugerido para varias cepas causantes de brotes en Europa (6,11).

A partir de los datos presentados, es claro que, en contraste con la situación en Europa, los aislamientos de VFA en América del Sur mostraron una considerable diversidad genética. Resultados semejantes han sido demostrados entre aislamientos de campo del tipo C, representativos de brotes en Argentina (7), del tipo O en Perú, Colombia y Venezuela (Malirat y col., manuscrito en preparación) y en otras regiones endémicas (4,19).

En general, las diferencias en los mapas T₁ se asocian con los cambios antigénicos, revelados por fijación del complemento (figura 1), y por la reactividad en una prueba ELISA con un panel seleccionado de anticuerpos monoclonales (2). Sin embargo, considerando la alta precisión de la caracterización molecular por *fingerprinting*, es

útil incluir esta información en un banco de datos de cepas del VFA actuantes en América del Sur. La misma favorecerá futuros estudios epidemiológicos acerca de la diseminación y mantenimiento del VFA en esta región.

REFERENCIAS

1. AARONSON, R.P., YOUNG, J.F., PALESE, P. Oligonucleotide mapping: evaluation of its sensitivity by computer-simulation. *Nucl. Acids. Res.*, 10: 237, 1982.
2. ALONSO, A., GOMES, M.P.D., RAMALHO, A.K., ALLENDE, R., BARAHONA, H., SÖNDAHL, M.S., OSORIO, F.A. Characterization of foot-and-mouth disease virus by monoclonal antibodies. *Viral Immunology*, 6 (3): 219-228, 1993.
3. ALONSO, A., GOMES, I., SÖNDAHL, M.S. Serological and immunological relationships among type A foot-and-mouth disease strains in South America. *Develop. Biol. Standard.*, 35: 231-235, 1977.
4. ANDERSON, E.C., UNDERWOOD, B.O., BROWN, F. Variation in foot-and-mouth disease virus isolates in Kenya: an examination of field isolates by T₁ oligonucleotide fingerprinting. *Vet. Microb.*, 10: 409-423, 1985.
5. 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.
6. BECK, E., STROHMAIER, K. Subtyping of European foot-and-mouth disease virus strains by nucleotide sequence determination. *J. Virol.*, 61 (5): 1621-1629, 1987.
7. 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 C₂) isolated in Argentina between 1981 and 1986. *Vaccine*, 6 (3): 245-252, 1988.
8. BERGMANN, I.E., TIRABOSCHI, B.H., BOLLER, M.A.A., MALIRAT, V., PEREIRA, P.J.V., AUGÉ DE MELLO, P. Desarrollo de un método más simple y rápido para el análisis bidimensional de oligonucleótidos del virus de la

- fiebre aftosa: minifingerprint de ARN./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: 35-42, 1989.
9. BERGMANN, I.E., MALIRAT, V., PEREIRA, P.J.V. Caracterización molecular de cepas del virus de la fiebre aftosa usadas para la producción de vacunas en Sudamérica./Molecular characterization of foot-and-mouth disease virus strains used for vaccine production in South America. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 58: 109-127, 1992.
 10. BISHOP, D.H.L. The application of RNA fingerprinting and sequencing to viral diagnosis. *Cur. Top. Microbiol. Immunol.*, 104: 259, 1983.
 11. CARRILLO, C., DOPAZO, J., MOYA, A., GONZALEZ, M., MARTINEZ, M.A., SAIZ, J.C.M., 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.
 12. 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.
 13. 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.
 14. CLEWLEY, J.P., BISHOP, D.H.L. Oligonucleotide fingerprinting of viral genomes. In: *New Developments in Practical Virology*. New York, Ed. Howard C., 1982. p. 231.
 15. COELEN, R.J., MACKENZIE, J.S. Genetic variation of Murray valley encephalitis virus. *J. gen. Virol.*, 69: 1903-1912, 1988.
 16. 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.
 17. 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.
 18. MALIRAT, V., AUGÉ DE MELLO, P., TIRABOSCHI, B., BECK, E., GOMES, I., BERGMANN, I.E. Genetic variation of foot-and-mouth disease virus during persistent infection in cattle. *Virus Research*, 34: 31-48, 1994.
 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. 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.
 21. PEREIRA, H.G. Antigenic variation in relation to epidemiology and control of foot-and-mouth disease. *Br. Vet. J.*, 138: 58-62, 1978.
 22. 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. p. 333-363.
 23. ROWLANDS, D.J., CLARKE, D.E., CARROLL, A.R., BROWN, F., NICHOLSON, B.H., BITTLE, J.L., HOUGHTEN, R.A., LERNER, R.A. Chemical basis of antigen variation in foot-and-mouth disease virus. *Nature*, 306: 694-697, 1983.
 24. RWEYEMAMU, M.M. Antigenic variation of foot-and-mouth disease: studies based on the virus neutralization reaction. *J. Biol. Stand.*, 12: 323-337, 1984.
 25. 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.
 26. TRINIDAD, J.J., MALIRAT, V., BERGMANN, I.E. Heterogeneidad entre tres cepas del virus de la fiebre aftosa, subtipo A₂₄ Cruzeiro usadas para la producción de vacunas./Heterogeneity among three foot-and-mouth disease subtype A₂₄ Cruzeiro virus strains used for the production of vaccines. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 58: 71-86, 1992.

**SEROLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF
FOOT-AND-MOUTH DISEASE SEROTYPE
O VIRUSES ISOLATED FROM OUTBREAKS IN BRAZIL
AND ARGENTINA BETWEEN 1958 AND 1983**

V. MALIRAT, I.E. BERGMANN, A. ALONSO, P.J.V. PEREIRA, M.A.A. BOLLER

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

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

SUMMARY. Genetic characterization of representative foot-and-mouth disease virus strains from major serotype O outbreaks which occurred between 1958 and 1983 in southeastern Brazil and centraleastern Argentina was obtained using T_1 maps. The results presented constitute the basis for a data bank to be applied in epidemiological studies.

Control of foot-and-mouth disease (FMD) in endemic regions is compromised by the considerable variability of the virus (16), which is responsible for its complex serology. FMDV exists in seven immunologically different types: O, A, C, SAT-1, SAT-2, SAT-3 and Asia-1 (22), each of which comprises an ever-increasing number of subtypes (21,24).

In South America, continuous surveillance of the field situation for the emergence of new variants is basically limited to classical serological assays (3). Since these methods do not provide definitive data on the relationships among individual outbreak strains, the sources from which the infection is spreading may be difficult to trace. Such information becomes more relevant in view of the success of eradication programs in progress in South American countries.

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

In contrast to serological assays, molecular approaches, such as RNA fingerprinting (10,14) and rapid sequencing (23), which analyze the primary genetic structure of the virus, allow a more precise measurement of the degree of relationship among viral strains, constituting a valuable epidemiological tool to follow the behavior of strains in the field.

Oligonucleotide fingerprinting has been especially useful to study the evolutionary relationships among closely related strains (12,13,15,18,25). Furthermore, its diagnostic application has been clearly demonstrated for FMDV. In fact, it has been applied to determine close relationships between most European field and vaccine viruses (11,17).

For South American strains, RNase T_1 maps of the prototype viruses used presently for vaccine production were registered (5,9), and heterogeneity was established within one of these strains (26). Moreover, the T_1 maps of subtype C_3 viruses isolated in Argentina between 1981 and 1986 were

also recorded (7). The present report extends this analysis to several relevant outbreak field strains of serotype O which occurred between 1958 and 1983 in Argentina and Brazil.

Viral strains obtained from the Pan American Foot-and-Mouth Disease Center collection were passaged in baby hamster kidney cell monolayer cultures to the minimal extent needed to provide RNA for analysis. In most cases, this involved three to four passages from field material, without using virus plaque purification methods. Preparation of ^{32}P -labeled RNA from the cytoplasm of infected cells was as reported before (5). The method of separation of T_1 oligonucleotides used was a modification of earlier techniques, and was performed as described (8).

Six isolates representative of different episodes which occurred over a twenty five-year pe-

riod in southeastern Brazil and centraleastern Argentina were studied. These were obtained from infected animals at the locations and dates indicated in table 1. Serological comparisons of these samples among themselves established a wide spectrum of relationships which were not proportional to the time elapsed between isolations (figure 1). This is shown by the relative similarity of virus O_1 C/58 with O_1 Arg/77 and O_1 Iri/83, isolated 19 and 25 years apart, respectively, and the marked difference between strains O_1 Cas/67 and O_1 Br/70, recovered three years apart.

Figure 2 shows the fingerprints from the RNAs of these six viruses. A schematic representation of the differences between them and the early strain O_1 C/58 is presented in figure 3. These comparisons revealed patterns which varied in many spots, except for virus O_1 Arg/77, which

Table 1. Representative FMDV strains isolated in Argentina and Brazil between 1958 and 1983

Strain designation	Origin County, State, Country	Date of isolation (Month/Year)
O_1 C/58	Campos, Rio de Janeiro, Brazil	01/1958
O_1 Cas/67	Caseros, Buenos Aires, Argentina	01/1967
O_1 Br/70	Bagé, Rio Grande do Sul, Brazil	09/1970
O_1 Arg/77	Unrecorded, Argentina	11/1977
O_1 Br/80	Dom Pedrito, Rio Grande do Sul, Brazil	06/1980
O_1 Iri/83	Hipólito Irigoyen, Buenos Aires, Argentina	09/1983

Abbreviations:

O_1 C/58, O_1 Campos Br 1/58; O_1 Cas/67, O_1 Caseros-Arg 2/67; O_1 Br/70, O_1 RS Brazil/70; O_1 Arg/77, O_1 Argentina/77; O_1 Br/80, O_1 RS Brazil/80; O_1 Iri/83, O_1 Irigoyen Argentina/83.

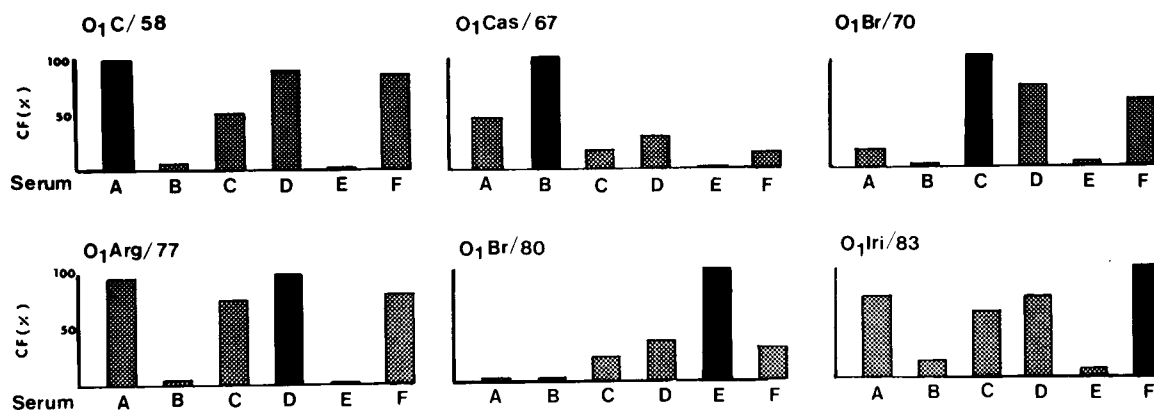


Figure 1. Serological analysis of the indicated viruses. Serological relationships were performed by complement fixation test at 50% hemolysis (CF) with the following sera: A, O₁ C/58; B, O₁ Cas/67; C, O₁ Br/70; D, O₁ Arg/77; E, O₁ Br/80; F, O₁ Iri/83

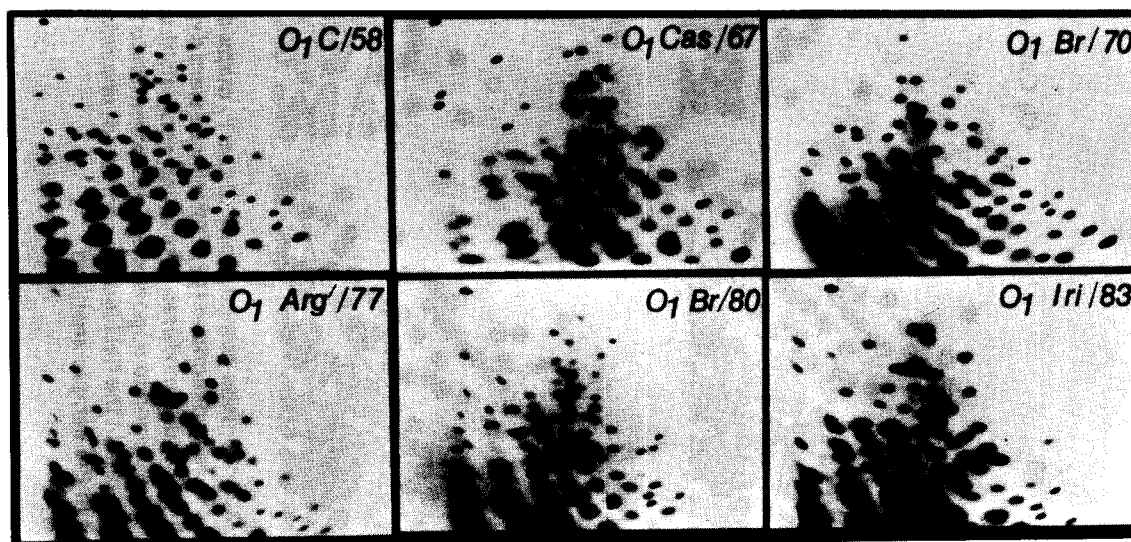


Figure 2. RNase T1 two-dimensional maps of ³²P-labeled RNA of the corresponding strains

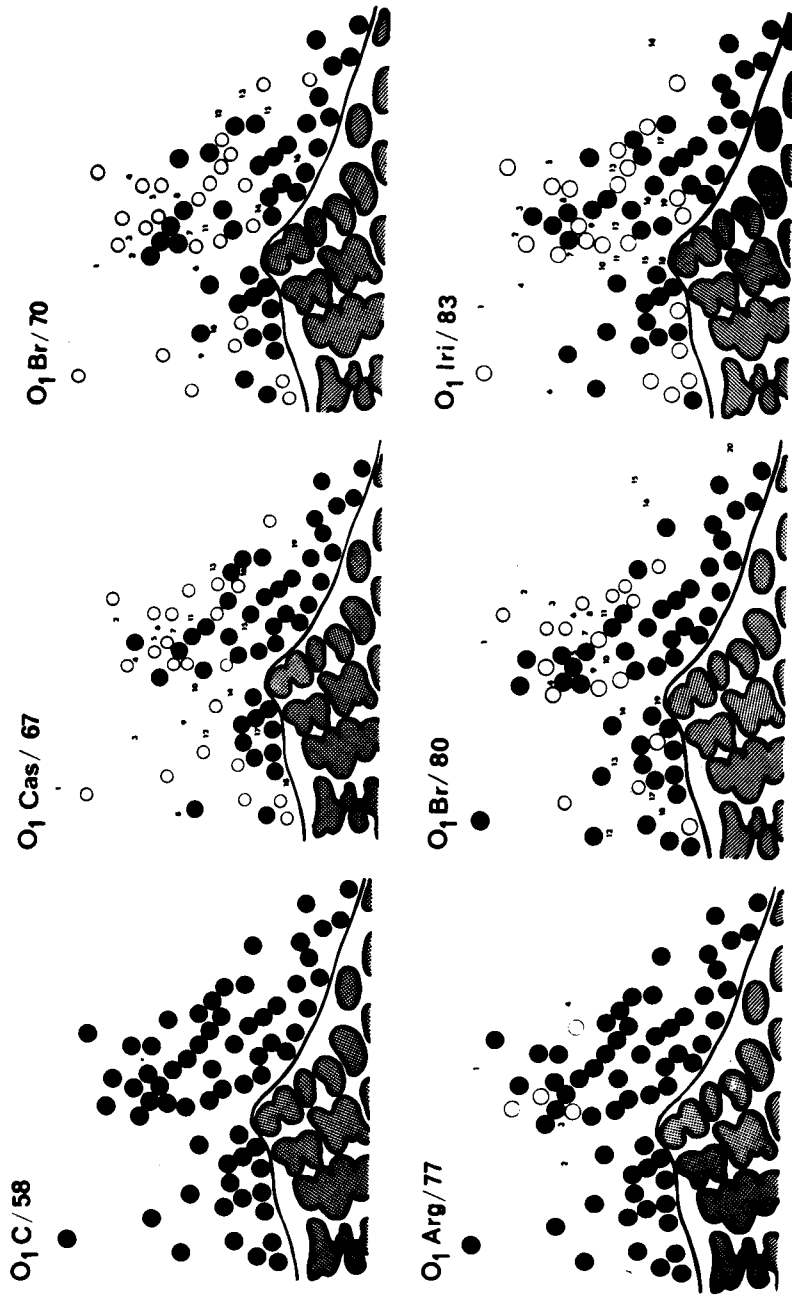


Figure 3. Schematic comparisons of the T₁ maps of the indicated strains with the early strain O₁ C/58. Criteria for analysis were as described (18). Differences were determined by comparing the migration of the viral oligonucleotides individually and in mixtures containing equivalent amounts of both T₁ digests. Keys for comparative analyses: solid circles correspond to oligonucleotides common to the strains compared; open circles represent spots of virus O₁ C/58 not present in the field isolate compared; uncircled numbers represent spots absent in the early strain O₁ C/58, but present in the sample analyzed

showed a T₁ map quite similar to that of the early strain, with only four additional and four missing spots. Values deduced from figure 3, calculated as reported previously (20), indicated that the genetic homology was always over 96% (O₁ Cas/67, 96.2%; O₁ Br/70, 96%; O₁ Arg/77, 99.3%; O₁ Br/80, 96.5% and O₁ Iri/83, 96.2%), falling within the expected range in which T₁ map differences of various RNA(s) may be compared (1).

In agreement with the serological data, the degree of variation did not correlate with the time elapsed between isolations. Moreover, there seemed to be no accumulation of variant oligonucleotides among the consecutive isolates. Similar conclusions could be drawn from nucleotide sequencing results (18).

Such patterns of variation suggest that the outbreak strains are likely to represent fluctuations of heterogeneous populations, with close to distant relationships to the consensus sequence. These populations may evolve independently from each other and may be selected under certain epidemiological situations. In the case of virus O₁ Arg/77 an alternative explanation could also be the accidental reintroduction of vaccine viruses in the field, as was suggested for many European outbreak strains (6,11).

From the data presented, it is clear that, in contrast to the situation in Europe, FMDV isolates in South America showed considerable genetic diversity. Similar results have been demonstrated among field isolates of type C representative of outbreaks in Argentina (7), of type O in Peru Colombia and Venezuela (Malirat et al., manuscript in preparation), and in other endemic regions (4,19).

Overall, T₁ map differences were associated with antigenic variations, as revealed by complement fixation (figure 1), and by their reactivity in an ELISA test with a selected panel of monoclonal antibodies (2). However, considering the high precision of molecular characterization by fingerprinting, the information is useful for inclusion in a data bank for FMDV strains acting in South America. This will favor future epidemiological studies on the maintenance and spread of FMDV in this region.

REFERENCES

1. AARONSON, R.P., YOUNG, J.F., PALESE, P. Oligonucleotide mapping: evaluation of its sensitivity by computer-simulation. *Nucl. Acids. Res.*, 10: 237, 1982.
2. ALONSO, A., GOMES, M.P.D., RAMALHO, A.K., ALLENDE, R., BARAHONA, H., SÖNDAHL, M.S., OSORIO, F.A. Characterization of foot-and-mouth disease virus by monoclonal antibodies. *Viral Immunology*, 6 (3): 219-228, 1993.
3. ALONSO, A., GOMES, I., SÖNDAHL, M.S. Serological and immunological relationships among type A foot-and-mouth disease strains in South America. *Develop. Biol. Standard.*, 35: 231-235, 1977.
4. ANDERSON, E.C., UNDERWOOD, B.O., BROWN, F. Variation in foot-and-mouth disease virus isolates in Kenya: an examination of field isolates by T₁ oligonucleotide fingerprinting. *Vet. Microb.*, 10: 409-423, 1985.
5. 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.
6. BECK, E., STROHMAIER, K. Subtyping of European foot-and-mouth disease virus strains by nucleotide sequence determination. *J. Virol.*, 61 (5): 1621-1629, 1987.
7. 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 C₃) isolated in Argentina between 1981 and 1986. *Vaccine*, 6 (3): 245-252, 1988.
8. BERGMANN, I.E., TIRABOSCHI, B.H., BOLLER, M.A.A., MALIRAT, V., PEREIRA, P.J.V., AUGÉ DE MELLO, P. Desarrollo de un método más simple y rápido para el análisis bidimensional de oligonucleótidos del virus de la fiebre aftosa: minifingerprint de ARN./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: 35-42, 1989.

9. BERGMANN, I.E., MALIRAT, V., PEREIRA, P.J.V. Caracterización molecular de cepas del virus de la fiebre aftosa usadas para la producción de vacunas en Sudamérica./Molecular characterization of foot-and-mouth disease virus strains used for vaccine production in South America. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 58: 109-127, 1992.
10. BISHOP, D.H.L. The application of RNA fingerprinting and sequencing to viral diagnosis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 104: 259, 1983.
11. CARRILLO, C., DOPAZO, J., MOYA, A., GONZALEZ, M., MARTINEZ, M.A., SAIZ, J.C.M., 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.
12. 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.
13. 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.
14. CLEWLEY, J.P., BISHOP, D.H.L. Oligonucleotide fingerprinting of viral genomes. In: *New Developments in Practical Virology*. New York, Ed. Howard C., 1982. p. 231.
15. COELEN, R.J., MACKENZIE, J.S. Genetic variation of Murray valley encephalitis virus. *J. gen. Virol.*, 69: 1903-1912, 1988.
16. 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.
17. KING, A.M.Q., UNDERWOOD, B.O., MCCAHOON, 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.
18. MALIRAT, V., AUGÉ DE MELLO, P., TIRABOSCHI, B., BECK, E., GOMES, I., BERGMANN, I.E. Genetic variation of foot-and-mouth disease virus during persistent infection in cattle. *Virus Research*, 34: 31-48, 1994.
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. 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.
21. PEREIRA, H.G. Antigenic variation in relation to epidemiology and control of foot-and-mouth disease. *Br. Vet. J.*, 138: 58-62, 1978.
22. 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. p. 333-363.
23. ROWLANDS, D.J., CLARKE, D.E., CARROLL, A.R., BROWN, F., NICHOLSON, B.H., BITTLE, J.L., HOUGHTEN, R.A., LERNER, R.A. Chemical basis of antigen variation in foot-and-mouth disease virus. *Nature*, 306: 694-697, 1983.
24. RWEYEMAMU, M.M. Antigenic variation of foot-and-mouth disease: studies based on the virus neutralization reaction. *J. Biol. Stand.*, 12: 323-337, 1984.
25. 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.
26. TRINIDAD, J.J., MALIRAT, V., BERGMANN, I.E. Heterogeneidad entre tres cepas del virus de la fiebre aftosa, subtipo A₂₄ Cruzeiro usadas para la producción de vacunas./Heterogeneity among three foot-and-mouth disease subtype A₂₄ Cruzeiro virus strains used for the production of vaccines. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 58: 71-86, 1992.

ENFOQUES MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO EN LABORATORIO DE LA INFECCIÓN PERSISTENTE CON EL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA: REVISIÓN

I.E. BERGMANN, V. MALIRAT

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS)

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

RESUMEN. Se describen nuevos enfoques para mejorar los métodos de identificación de infecciones persistentes con el virus de la fiebre aftosa (VFA). Los mismos consistieron en la detección de fragmentos genómicos específicos del VFA en muestras obtenidas de la región esofágico-faríngea por medio de técnicas de hibridación, aplicadas con o sin previa amplificación del material mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Asimismo, para la identificación de anticuerpos específicos contra el VFA, indicativos de replicación viral, se llevó a cabo el desarrollo de un método inmunoenzimático altamente sensible y específico basado en el uso como sondas serológicas de antígenos no estructurales purificados del VFA, obtenidos por técnicas de ADN recombinante.

La habilidad que tiene el virus de la fiebre aftosa (VFA) de establecer infecciones subclínicas en ciertos hospedadores, como bovinos y otros ruminantes (5,8,15,18,39-41), tiene gran importancia para los programas de prevención, control y erradicación de la FA. En este sentido, la detección de replicación del VFA en animales que no manifiestan síntomas de la enfermedad es tan relevante como el diagnóstico de infección aguda.

La identificación de animales con infección persistente del VFA se realiza actualmente a través de la detección de anticuerpos contra el (los) antígeno(s) asociado(s) a la infección viral (VIAA) mediante el ensayo de inmunodifusión en gel de agarosa (IDGA) (1,10,11,21,26,30), y del aislamiento del virus en cultivo de células a partir del material de fluido esofágico-faríngeo (OP) (8, 20,36,38). Sin embargo, estos métodos no siempre llevan a resultados conclusivos. Se ha establecido experimentalmente que la identificación de anti-

cuerpos anti VIAA no siempre se correlaciona con la recuperación de virus a partir de fluido OP. Asimismo, la detección del estado persistente durante las fases tardías de la infección fue posible solo en raras oportunidades. El virus se recuperó de muestras OP solo ocasionalmente, y la baja sensibilidad del ensayo de IDGA no permitió la identificación de anticuerpos anti VIAA (6,14).

Los programas en vigencia para la erradicación hemisférica de la FA, basados en la regionalización por ecosistemas y flujos comerciales, tienen entre sus principales objetivos la identificación, preservación y ampliación de áreas libres de la enfermedad. El rápido progreso de estos programas, especialmente en la Cuenca del Plata, enfatiza la necesidad de contar con métodos rápidos e inequívocos que permitan demostrar con mayor confiabilidad la ausencia de actividad viral.

Las técnicas de genética molecular han provisto herramientas poderosas para definir nuevos procedimientos para el diagnóstico de una posible infección subclínica. Esta revisión enfocará las estrategias que se han llevado a cabo hasta el

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

presente para mejorar los métodos de identificación de infecciones persistentes de VFA.

CLONADO MOLECULAR DEL cADN OBTENIDO POR TRANSCRIPCIÓN REVERSA DEL ARN DEL VFA

Un requisito fundamental para la introducción de nuevas herramientas de diagnóstico de infección subclínica con el VFA, fue el clonado molecular del ARN monocatenario del virus. Esta técnica consiste básicamente en la inserción de un fragmento de ADN exógeno en un plásmido bacteriano (pedazo de ADN externo al cromosoma bacteriano) el cual contiene un gen de resistencia a un antibiótico, la introducción de dicho plásmido en una bacteria, y posteriormente la selección por medio del antibiótico de aquellas células que se tornaron resistentes al mismo. Las bacterias que contienen el plásmido que lleva el ADN exógeno, en nuestro caso VFA, son fáciles de identificar, si este último es clonado en el medio de un gen de resistencia a un segundo antibiótico, destruyendo su actividad. Estos plásmidos van a conferir resistencia al primero de los antibióticos, pero no al segundo, permitiendo así la identificación de las bacterias que contienen el plásmido recombinante (figura 1).

Para clonar las secuencias del ARN del VFA, debe sintetizarse primero una copia de ADN complementario al ARN (VFA-cADN). Una vez que la secuencia de VFA-cADN de interés se ha clonado en un plásmido, se pueden obtener grandes cantidades del mismo creciendo los cultivos bacterianos y, subsecuentemente, purificando el ADN plasmídico del ADN cromosomal. Esto proporciona cantidades abundantes del cADN, para ser usado como sonda molecular para detectar secuencias genómicas del VFA en ensayos de

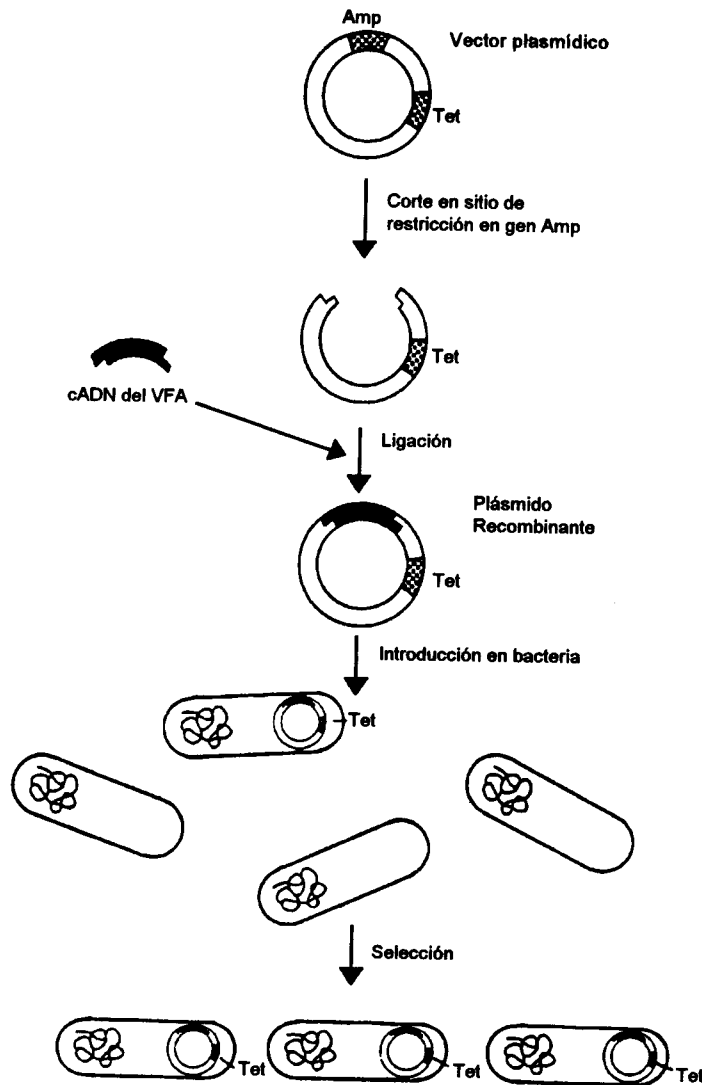


Figura 1. Representación esquemática del clonado de ADN en un plásmido.

hibridación. Además, la colección de distintos fragmentos de VFA-cADN clonados, que codifican para proteínas virales específicas, pueden insertarse en plásmidos bacterianos de expresión, y de esta manera la proteína seleccionada puede ser producida y purificada del lisado bacteriano. Así pueden obtenerse sondas serológicas por bioingeniería.

El ARN monocatenario correspondiente al genoma del VFA fue clonado en el plásmido

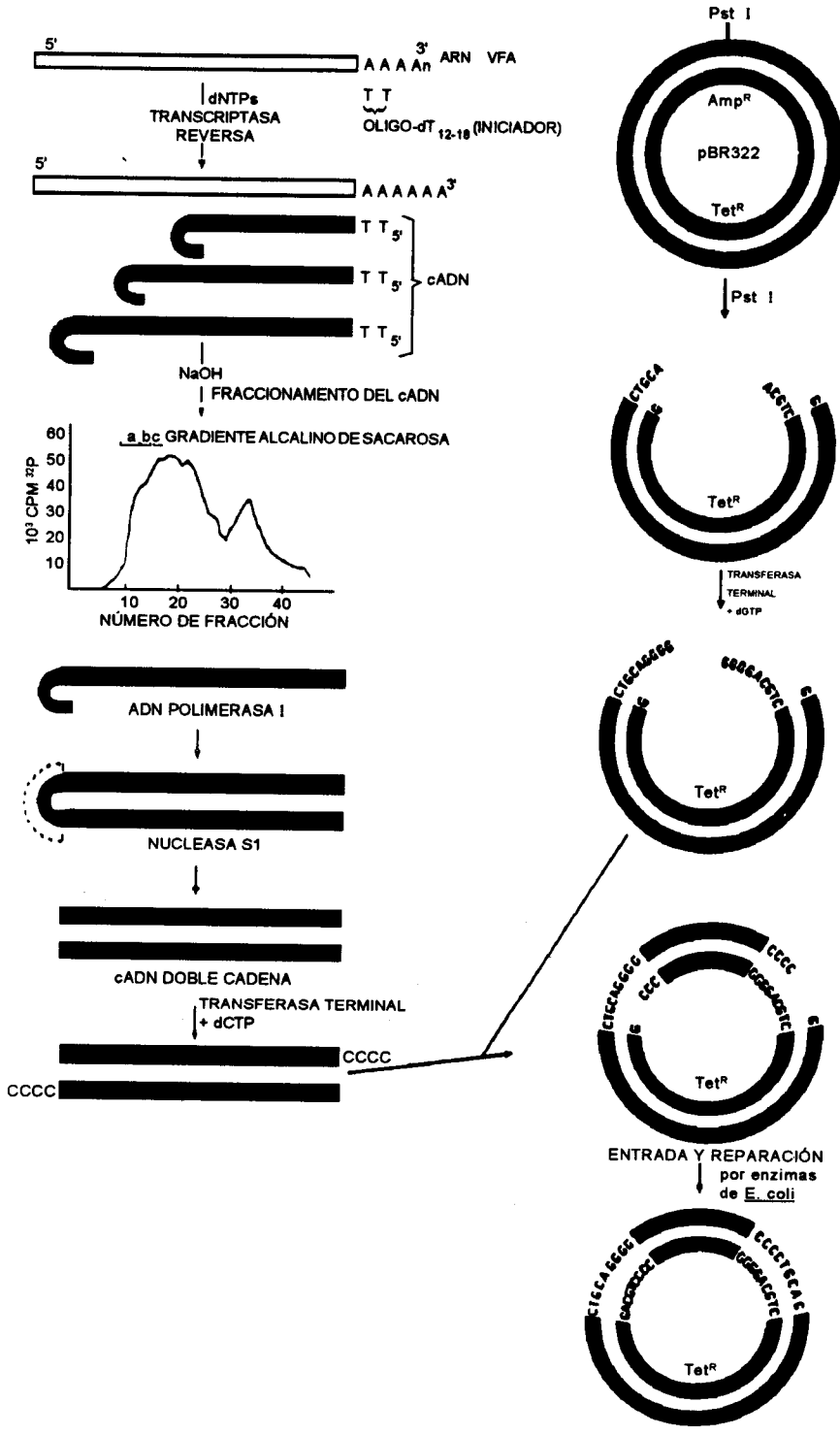


Figura 2. Estrategia de clonado del VFA-cADN. El ARN poliadenilado, purificado, sirvió como templado para la síntesis de la primera cadena de ADN complementario (cADN), usando oligo (dT)₁₂₋₁₈ como iniciador, y transcriptasa reversa. La cadena de ARN del híbrido ARN-cADN fue degradada mediante digestión alcalina. Por medio de un gradiente alcalino de sacarosa, el cADN se separó en tres fracciones de distintos tamaños, a (2000-4000 bases), b (4000-6000 bases) y c (6000-8000 bases). La síntesis de la segunda cadena, a partir de cada una de las fracciones, se realizó mediante la ADN polimerasa I, luego se agregaron pequeñas concentraciones de nucleasa S1 para clivar la estructura de horquilla resultante. El cADN doble-cadena fue terminalizado con homopolímeros de aproximadamente 10 a 15 residuos de dCMP, usando deoxinucleotidil transferasa terminal. Posteriormente, el vector plasmídico pBR322 (el cual contiene un gen de resistencia a ampicilina y otro a tetraciclina) se terminalizó con residuos de dGMP, previa linearización con Pst I, en el sitio de resistencia a ampicilina y se anilló con el oligo(dC)-cADN doble-cadena. Este cADN recombinante se usó para transformar *Escherichia coli* HB101. Los clones tetraciclina resistentes y ampicilina sensibles se seleccionaron por hibridación en colonia. Amp^R: sitio de resistencia a ampicilina. Tet^R: sitio de resistencia a tetraciclina.

pBR322 como se esquematiza en la figura 2. Se obtuvieron clones que cubrían toda la región codificante del genoma.

EL VFA-cADN CLONADO COMO UN REACTIVO DE DIAGNÓSTICO PARA LA DETECCIÓN DEL VFA POR TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Este método de detección se basa en la habilidad de las cadenas complementarias de los ácidos nucleicos, ya sean ADN-ADN, ADN-ARN, o ARN-ARN, de aparearse y formar una molécula bicatenaria. Esta estructura híbrida está formada por dos hebras polinucleotídicas complementarias unidas por puentes de hidrógeno entre pares de bases complementarias. Este dímero es estable en condiciones fisiológicas normales, pero se disocia (desnaturaliza) en las hebras monocatenarias que lo componen cuando es calentado o expuesto a pHs extremos.

Para la detección del VFA, se utiliza una sonda específica de VFA-cADN monocatenaria desnaturalizada la cual hibrida con el ARN viral complementario. La reacción se realiza directamente sobre especímenes (hibridación *in situ*) o luego de inmovilizar el ARN en un soporte sólido (dot-blot o slot-blot). Las sondas se marcan generalmente con radionucleótidos o con biotina, para permitir la detección de los híbridos específicos (figura 3).

Un requisito fundamental para la aplicación de este método como herramienta de detección específica de secuencias genómicas del VFA en fluidos OP de animales potencialmente infectados, es la demostración de que la sonda de cADN viral clonada, marcada radioactivamente, hibrida específicamente con el ácido nucleico viral, y no con ARN total de la región OP. Como se muestra en el ejemplo de la figura 4, cuando ARN total, extraído de muestras de fluidos OP de animales infectados experimentalmente con VFA, se fijó en papel de nitrocelulosa y se hibridó con VFA-cADN clonado marcado con ^{32}P , se observó hibridación específica solamente luego de la infección.

A pesar de que los métodos de hibridación no son tan sensibles como los procedimientos de

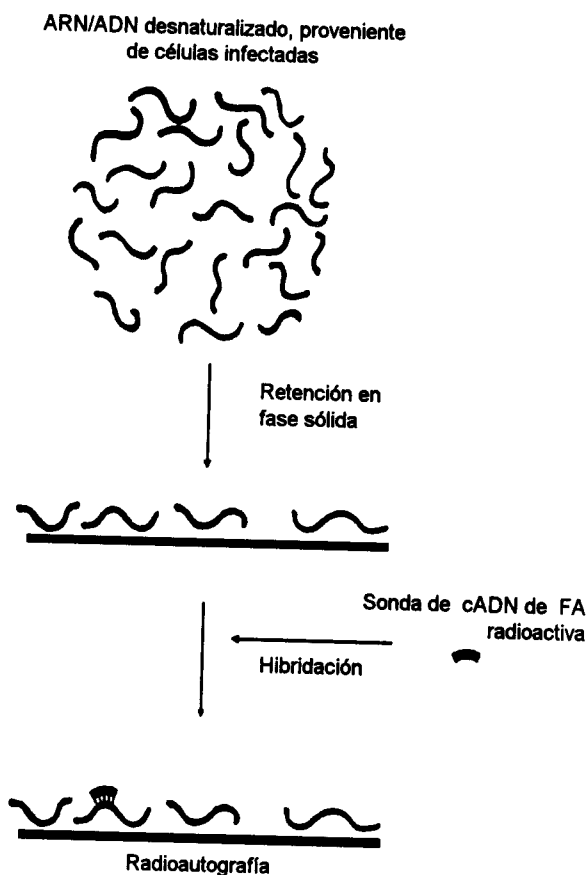


Figura 3. Representación esquemática de la hibridación del ARN, fijado en un soporte sólido, con una sonda de cADN específico.

recuperación viral (25,34), varias muestras correspondientes a etapas avanzadas de la infección, que resultaron positivas por dot-blot, fueron negativas cuando se las ensayó por infectividad en cultivos celulares (ejemplo en la figura 4). Estos resultados son compatibles con los que fueron informados previamente por Rossi y cols. (34) y sugieren que durante la persistencia tardía, pueden producirse grandes cantidades de partículas virales progenie no infectivas. Así, la hibridación de ácidos nucleicos resulta especialmente útil ya que detecta incluso genomas virales inactivos o incompletos que, bajo circunstancias adecuadas, podrían originar virus infectivo.

Asimismo, este método no es afectado por las numerosas dificultades que presenta la técnica

convencional de detección, basada en el aislamiento de virus en cultivo de células a partir de fluidos OP. Por ejemplo, la recuperación viral en cultivos puede verse impedida por la cantidad y calidad del material obtenido, así como por anticuerpos remanentes en las muestras a pesar del tratamiento con TTE (38). Además, variantes seleccionadas debido a la replicación del virus en el animal (9,13,14,23,35,36) podrían crecer dificultosamente y en un rango limitado de cultivos de células. Otra limitación del método de aislamiento en cultivo de células es que un resultado negativo podría requerir tanto cuanto 14 días para confirmarse, mientras que, si ocurre replicación viral, el virus debe identificarse por medio de ensayos suplementarios.

Una ventaja adicional del método de hibridación de ácidos nucleicos, es que se pueden detectar diferentes serotipos del VFA usando una única sonda de cADN clonado. La base molecular de dicha hibridación género-específica es el alto grado de homología que existe entre las secuencias de los ácidos nucleicos de los diferentes serotipos, en regiones genómicas correspondientes a proteínas tales como la polimerasa viral (24). Este amplio espectro de detección facilita enormemente la búsqueda de animales sospechosos. Además, si es preciso, puede llevarse a cabo simultáneamente la tipificación del virus implicado usando sondas de cADN correspondientes a la proteína estructural VP₁ de cada serotipo individual (25).

La hibridación directa en tejidos fijos es también una herramienta valiosa, especialmente para estudios de patogenicidad viral (7), ya que permite la identificación directa de las células blanco infectadas con el virus, así como una estimación de la proporción de células dentro de una sección de tejido que contienen al genoma viral.

AMPLIFICACIÓN ESPECÍFICA DE SEGMENTOS DE ARN GENÓMICO DE VFA

Como fuera mencionado anteriormente, los ensayos de hibridación de ácidos nucleicos no son tan sensibles como los procedimientos de aislamiento de virus. Esta limitación puede superarse actualmente amplificando primero el

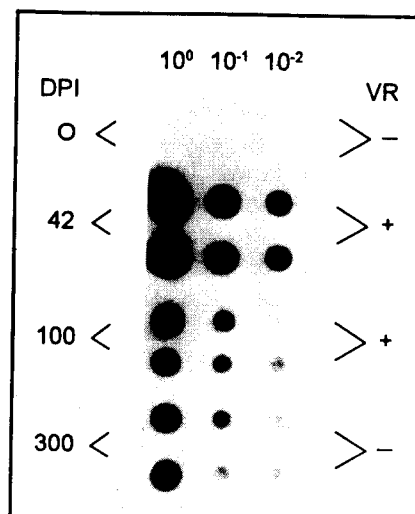


Figura 4. Ejemplos de la hibridación del VFA-cADN con ARN total de fluidos OP de animales persistentemente infectados en forma experimental. En el filtro de nylon se aplicaron, por duplicado, diluciones al décimo del ácido nucleico de fluidos OP de animales previo a o luego de la infección experimental con VFA, y se hibridaron con fragmentos de cADN correspondientes a la región que va desde 6.3 hasta 7.8 kilobases del genoma viral, marcados con ³²P. La exposición autoradiográfica se realizó a -80°C por 18 horas. DPI, días posinoculación. VR, recuperación de virus en cultivos celulares.

material a ser analizado, usando el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (28). En esta técnica, el ADN bicatenario es desnaturizado por calor, y dos oligonucleótidos iniciadores se hibridan a secuencias complementarias en ambos lados del templado. Estos iniciadores, que flanquean la región que será amplificada en el ADN blanco, son extendidos usando la ADN polimerasa Taq, que es termoresistente, duplicando así la secuencia de interés. Como los productos de la extensión de los iniciadores pueden servir como templado en el próximo ciclo, hay una acumulación exponencial de fragmentos específicos cuyos extremos están definidos por las terminaciones 5' de los iniciadores. Así, 20 ciclos pueden rendir una amplificación de aproximadamente un millón de veces (figura 5). El

material amplificado puede visualizarse por electroforesis en gel de agarosa y, posteriormente, caracterizarse.

Para la detección de ARN viral es necesario obtener primero una copia de cADN, por transcripción reversa, que luego es usada como ADN templado en la reacción de PCR.

La transcripción reversa del ARN del VFA se llevó a cabo a partir de células infectadas. Fueron amplificados segmentos de 850 bases que cubrían la región completa de VP₁, y de 2070 bases que cubrían la región genómica que codifica para las proteínas de la cápside VP₃, VP₂ y VP₁, resultando en una banda prominente del tamaño esperado para cada caso (figura 6). Los iniciadores seleccionados correspondían a regiones conservadas del genoma del VFA, de forma tal que fue posible la amplificación de los serotipos O, A y C del VFA. La especificidad del material amplificado fue confirmada por análisis con enzimas de restricción (datos no mostrados). La caracterización también puede llevarse a cabo por hibridación usando una sonda apropiada, y por secuenciamiento de los productos de amplificación (19,22,27). Se ha intentado la identificación tipo-específica usando iniciadores serotipo-específicos en la amplificación (33).

Cuando se lo compara con ensayos de infectividad, el PCR es generalmente 10⁴ veces más sensible (4). Esto se atribuye parcialmente a la habilidad del PCR de amplificar a partir de ARN no infectivo.

Si se pretende usar el PCR como herramienta de identificación de animales con infección subclínica, un importante requisito es la adaptación del método a la amplificación y detección de ácidos nucleicos del VFA a partir de muestras de fluidos OP. En este sentido ha sido descrita la amplificación directa a partir de muestras de fluidos OP, omitiendo así la necesidad de purificar el ARN (16). Sin embargo, otros estudios describen la presencia de inhibidores en los fluidos OP, inclusive luego de la purificación del ARN, lo que compromete la alta sensibilidad de esta técnica (4,17). Esto puede limitar las aplicaciones del PCR en diagnóstico. Se están conduciendo experimentos con el fin de clarificar este punto.

Una gran ventaja de este método rápido y sensible para la detección del VFA, es que la información de la secuencia de nucleótidos puede obtenerse directamente de muestras clínicas sin

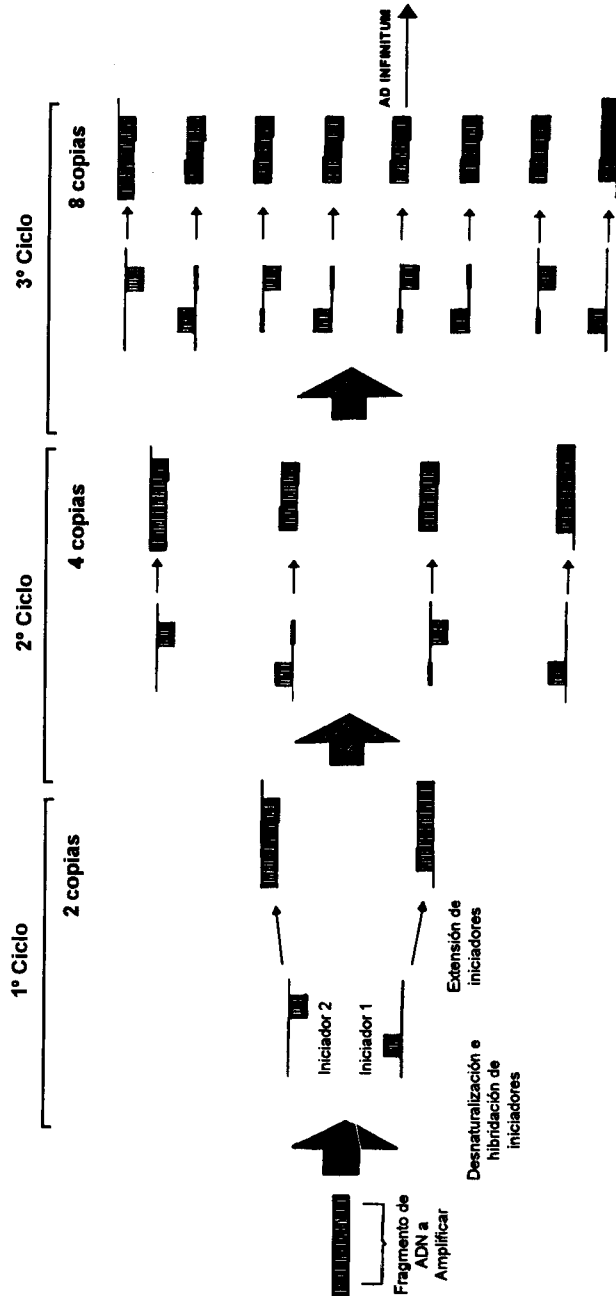


Figura 5. Representación esquemática del método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

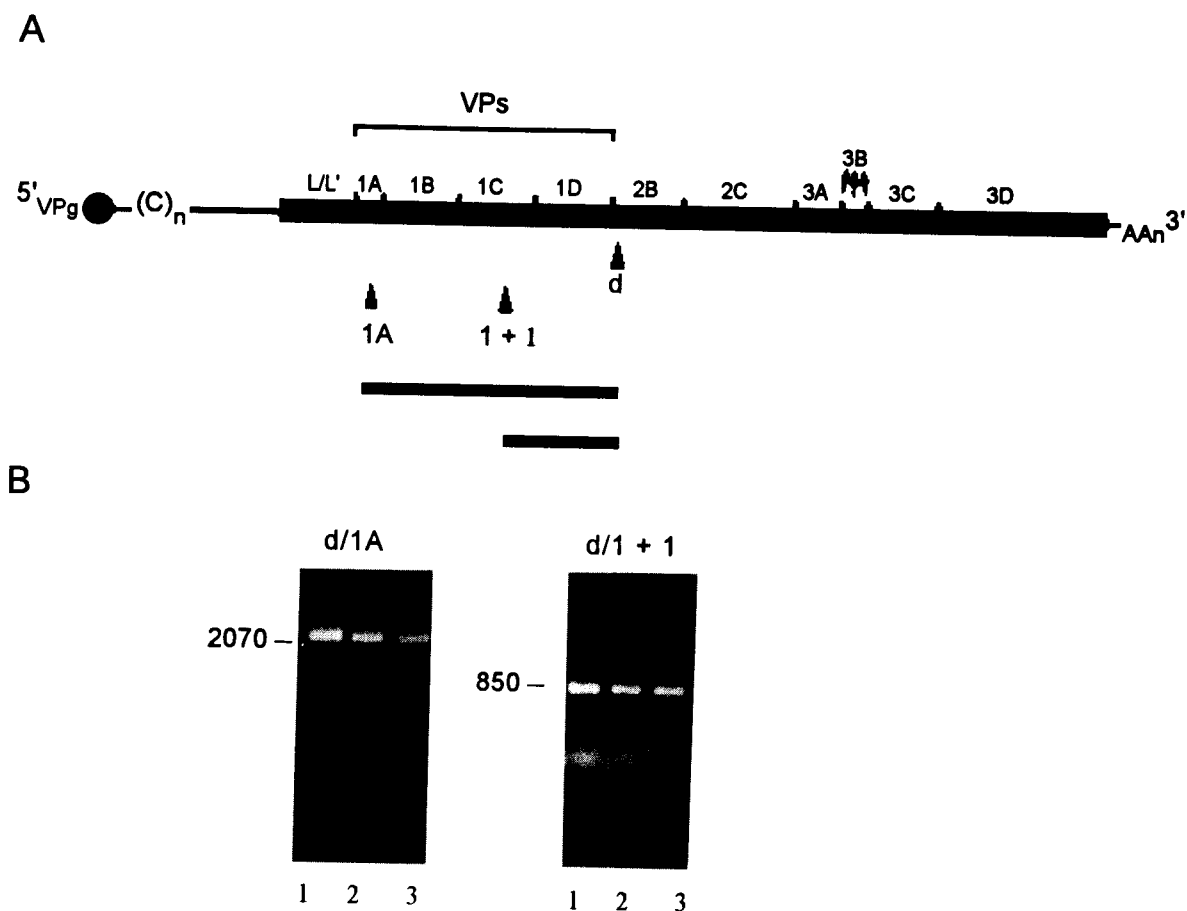


Figura 6. A. Esquema representativo de la región genómica viral, que codifica para las proteínas de la cápside (VPs), que fue usada como templado en la amplificación enzimática por PCR. Las flechas marcan la posición de los iniciadores utilizados. El iniciador d contiene una secuencia complementaria al ARN, mientras que los iniciadores 1A y 1+1 contienen la misma secuencia y polaridad que el ARN. Las barras negras indican la extensión y posición de los fragmentos amplificados. **B.** Geles de 1% de agarosa, teñidos con bromuro de etidio de 1/30 del producto de la reacción de PCR, correspondiente a los cADN de los virus 1) O, Campos Br1/58, 2) A₂₄ Cruzeiro Br1/55 y 3) C3 Indaial Br1/71. Las distintas combinaciones de los iniciadores utilizados, así como el tamaño, (en pares de bases), de los productos esperados, se indican para cada caso.

necesidad previa de amplificación del virus en cultivo de células. Esto elimina la posibilidad de inducir una selección y modificación de las poblaciones virales *in vitro*. Debido a inhibidores potenciales en muestras de OP, esta ventaja puede no ser siempre útil en la caracterización de virus persistentes. Sin embargo, sí puede aplicarse a las fases agudas de infección con VFA, durante las

cuales pueden obtenerse cantidades abundantes de virus a partir de tejidos epiteliales de la lengua y del espacio interdental. Así, la amplificación de secuencias de la VP₁, por medio del PCR, en combinación con el secuenciamiento directo del ADN amplificado proporciona un método promisorio para estudios de epidemiología molecular.

NUEVAS HERRAMIENTAS Y REACTIVOS PARA DETECTAR ANTICUERPOS ANTI VFA EN SUERO DE ANIMALES PERSISTENTEMENTE INFECTADOS CON VFA

Una importante limitación encontrada cuando se usa VIAA como sonda serológica para detectar anticuerpos contra antígenos asociados a la infección con VFA, es la necesidad de producirlo en cultivo de células, por ejemplo de riñón de cría de hamster (BHK). Tal antígeno a) es caro, b) tiene una vida media limitada, c) necesita ser estandarizado en cada nuevo preparado, y d) potencialmente contiene antígenos que pueden ser reconocidos por el suero de animales inmunizados con vacunas preparadas a partir de cultivos de células, lo que podría llevar a ensayos falso positivos. De hecho, se han informado resultados positivos obtenidos por IDGA en sueros de animales luego de la vacunación (2, 11, 30). Este problema se acentuó cuando se intentó aplicar una técnica más sensible como ELISA (3).

El reemplazo del VIAA por antígenos no estructurales expresados en bacteria es de considerable interés. Como las proteínas se obtienen a partir de fragmentos genómicos que codifican específicamente para cada una de ellas, su expresión proporciona productos molecularmente definidos. Esto elimina una potencial contaminación con proteínas estructurales o con polipéptidos de BHK, que podrían llevar a resultados positivos con sueros de animales vacunados. La simplicidad con que pueden obtenerse grandes cantidades del material, facilita la purificación a homogeneidad, de tal forma que pueden emplearse métodos inmunoenzimáticos altamente sensibles sin comprometer la especificidad de las reacciones. Además, los cultivos bacterianos requieren menos espacio, tiempo y esfuerzo que los de células eucariotas y son considerablemente más económicos. La absoluta inocuidad del ensayo es particularmente relevante en regiones libres de fiebre aftosa, ya que no hay VFA infectivo o no infectivo involucrado en ninguna etapa del proceso de producción de los antígenos. Esto elimina la necesidad de laboratorios de alta seguridad de elevado costo. Finalmente, pueden prepararse fácilmente sondas serológicas

de cualquier polipéptido no estructural a través de técnicas de ADN recombinante. Así, estudiando la respuesta de anticuerpos del hospedador hacia las diferentes proteínas durante las varias etapas de la persistencia, pueden identificarse cuáles de estos antígenos serían más aptos para un potencial uso en diagnóstico.

USO DE UNA ARN POLIMERASA EXPRESADA EN BACTERIAS EN UN ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO DE ELECTROTRANSFERENCIA (EITB)

Dada la estrecha relación entre el VIAA y la ARN polimerasa viral (3D) (31, 32), se llevaron a cabo intentos de expresar esta última en bacterias.

Para obtener el antígeno más adecuado para ser usado como sonda serológica, fue construido un vector de expresión que incluía ADN que codificaba para la polimerasa 3D completa (29). Este vector llevaba el promotor inducible pL del bacteriófago Lambda, delante de la secuencia consenso de Shine Dalgarno. La polimerasa expresada contenía solo un aminoácido adicional, la metionina N-terminal, y fue purificada a partir de la fracción soluble de los extractos bacterianos por cromatografía en columna de fosfocelulosa seguida de otra columna de poli(U)-Sephara. La proteína 3D purificada fue usada luego en un ensayo de EITB para identificar la presencia de anticuerpos anti-polimerasa en suero de animales persistentemente infectados en forma experimental (29).

El EITB combina la capacidad resolutive de la electroforesis en gel con la sensibilidad y especificidad de las reacciones inmunoenzimáticas. El antígeno no marcado es resuelto mediante una corrida electroforética y transferido a una membrana de nitrocelulosa. Luego de bloquear sitios de unión inespecíficos en la membrana, se lleva a cabo la reacción inmunoenzimática incubando el suero problema (no marcado), seguido de un segundo anticuerpo acoplado a una enzima que funciona como reactivo de detección.

Como se muestra en los ejemplos de la figura 7, la unión de los anticuerpos al antígeno 3D ocurrió durante todo el estado persistente, manteniéndose inclusive a tiempos tardíos. En

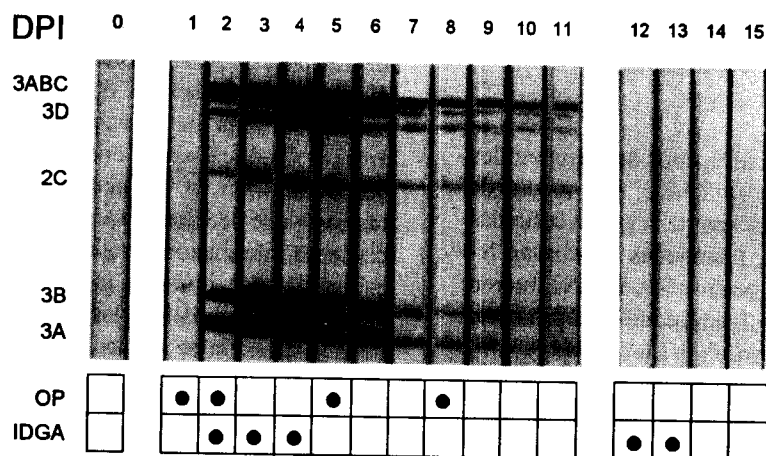


Figura 7. Reactividad de los antígenos no estructurales 3A, 3B, 2C, 3D y 3ABC, producidos por bioingeniería, con suero de animales infectados con VFA. Con un punto de indican el aislamiento de virus de fluidos OP (OP) y las determinaciones positivas de VIAA (IDGA). 7 ng/mm de cada uno de los antígenos no estructurales purificados, obtenidos por expresión en bacteria como se describió anteriormente (29), fueron separados en un gel de poliacrilamida 12,5% (SDS-PAGE). La transferencia electroforética a papel de nitrocelulosa, y la reacción inmunoenzimática, se llevaron a cabo como fue descrito anteriormente (29). Sueros de animales infectados fueron analizados a varios días posinfección (DPI). Calle 1, 7 DPI; calle 2, 42 DPI; calle 3, 154 DPI; calle 4, 231 DPI; calle 5, 280 DPI; calle 6, 315 DPI; calle 7, 448 DPI; calle 8, 546 DPI; calle 9, 602 DPI; calle 10, 644 DPI; calle 11, 742 DPI. Las tiras con controles incluían sueros negativos para VFA provenientes de: bovino previo a la infección (calle 0); animales revacunados a 30 días luego de la primovacuna, calles 12 y 13; regiones libres de FA, calles 14 y 15.

estos tiempos todas las reacciones obtenidas con el ensayo convencional de IDGA fueron negativas y solo ocasionalmente se recuperó virus de fluidos OP. La alta especificidad del EITB fue indicada por la falta de reactividad de suero de animales sin previa exposición al VFA o a sus antígenos virales, incluyendo muestras de animales infectados con una variedad de virus bovinos (6).

A pesar de su mayor sensibilidad, el EITB eliminó un número considerable de resultados positivos generados por IDGA con sueros de animales luego de la vacunación (6). Considerando que el VIAA usado es solo parcialmente purificado de células BHK infectadas, los resultados de IDGA

sugieren que trazas de polipéptidos de la cápside del VFA, o de antígenos de BHK, podrían haber sido reconocidas por el suero de animales inoculados con vacunas producidas en BHK, llevando así a resultados falso-positivos.

Sin embargo, la presencia de polimerasa residual en algunas preparaciones de vacunas fue sugerida por la reactividad ocasional de la proteína 3D expresada con sueros de animales luego de la vacunación. Los intentos para superar esta limitación han incluido el uso adicional de otros antígenos no estructurales virales obtenidos por bioingeniería tal como se describe en la próxima sección.

USO DE LOS ANTÍGENOS NO ESTRUCTURALES 3A, 3B, 2C y 3ABC EXPRESADOS EN BACTERIAS, EN EL EITB

Para obtener los antígenos no estructurales del VFA 3A, 3B, 2C y 3ABC, por medio de técnicas de ADN-recombinante, regiones definidas del genoma del VFA, fusionadas al extremo N-terminal del gen de la polimerasa de MS2, fueron expresadas en bacterias bajo el control del promotor inducible pL del bacteriófago Lambda (37).

Como ocurriera con el polipéptido expresado 3D, la unión de los antígenos anteriormente mencionados a los anticuerpos resultó positiva aun en etapas tardías de la persistencia (figura 7). Nuevamente, no se detectó reacción con sueros de regiones libres de fiebre aftosa, inclusive sueros con alto título de anticuerpos para otros varios virus bovinos, tanto a ARN como a ADN.

Los sueros de animales luego de la vacunación, que resultaron positivos por IDGA usando VIAA, incluyendo aquellos que mostraban una reactividad por EITB con la polimerasa recombinante, no dieron reacción detectable con de los antígenos 3A, 3B, 2C ó 3ABC. Así, se sugiere que el uso tanto de la polimerasa aisladamente cuanto del VIAA usado tradicionalmente, no es adecuado para distinguir si la seropositividad de las muestras de campo es atribuible a infección o vacunación. De hecho, aunque el EITB es considerablemente más sensible, el uso del IDGA llevó a una sobrestimación sustancial de bovinos persistentemente infectados provenientes de regiones endémicas, posiblemente debido a la reactividad de muestras de animales luego de la vacunación. Esto indicó claramente la relevancia del uso de antígenos no estructurales seleccionados del VFA para identificar sueros de animales infectados sin ambigüedades (6).

Otra característica importante de esta técnica es que con un único ensayo serológico puede detectarse la infección con cualquier serotipo del VFA.

Los estudios descriptos demostraron que, a pesar de la alta sensibilidad que posee el EITB para identificar anticuerpos remanentes luego de la

infección, este es un ensayo altamente confiable para eliminar falsos positivos detectados por el IDGA. De esta forma, como el EITB es capaz de identificar la ausencia de actividad viral, su aplicación sería particularmente importante en áreas de América del Sur donde existen programas de erradicación en vigencia, particularmente en regiones que se encuentran próximas al reconocimiento internacional como área libre de FA, y especialmente durante las últimas etapas de vacunación sistemática y las primeras etapas luego de la suspensión de la vacunación. Asimismo, se evitaría un gran número de resultados falso-negativos por IDGA durante las pruebas para importación/exportación, simplificando sustancialmente este proceso.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Aunque las infecciones persistentes del VFA son ampliamente reconocidas, no se han establecido con exactitud, ni la incidencia en el campo, ni la duración real de las mismas. La razón para este insuficiente conocimiento de temas tan importantes, es la dificultad para obtener un diagnóstico inequívoco de tales infecciones.

Las técnicas moleculares han permitido mejorar significativamente el diagnóstico de la persistencia del VFA. De hecho, el método de PCR puede alcanzar una sensibilidad equivalente a 10^{-2} DICT₅₀ (4). Además, el desarrollo de métodos inmunoenzimáticos junto con el uso de sondas serológicas purificadas obtenidas por bioingeniería permiten detectar anticuerpos en sueros de animales infectados persistentemente con VFA en etapas tardías, con alta sensibilidad y especificidad.

La implementación de estos métodos altamente sensibles y específicos sería de enorme importancia para identificar áreas libres de FA, para las pruebas de control de importación/exportación, como así también como herramienta epidemiológica para establecer la incidencia de la persistencia del VFA en el campo. Sin embargo, una interpretación precisa de estos métodos que mejoran tanto la detección del material genómico viral, cuanto la de anticuerpos específicos contra el

virus, debería estar acompañada de un entendimiento profundo de los mecanismos moleculares e inmunológicos que tienen lugar durante el estado persistente en el animal.

Cuando se trata de enfoques inmunoenzimáticos, hay que tener en cuenta que la detección de anticuerpos anti-virus indica una replicación viral que tuvo lugar en el pasado, pero que no necesariamente se mantiene. De hecho, la mayoría de los animales persistentemente infectados con VFA en etapas tardías, con respuesta serológica positiva, no dieron resultados positivos de recuperación viral, medida por el ensayo de infectividad (figura 7) (29). Sin embargo, se han obtenido resultados positivos por hibridación entre estas muestras (figura 4). Aparentemente, esto ocurriría pues la persistencia del VFA podría originar la presencia de una alta proporción de mutantes virales no infectivos o de genomas virales incompletos en fluidos OP, como se demostró para cultivos celulares persistentemente infectados con VFA (12). Esto podría explicar la dificultad que existe para aislar virus infectivo a partir de fluidos OP durante las etapas tardías del estado persistente (14, 23, 29).

Las técnicas de ADN recombinante no solo han contribuido significativamente para mejorar el diagnóstico de las infecciones subclínicas del VFA, sino que han permitido también un avance importante en el estudio de los mecanismos que tienen lugar durante la replicación del virus en animales persistentemente infectados. Estas investigaciones se encuentran actualmente en una fase muy dinámica.

La interpretación precisa del significado epidemiológico del estado persistente en el campo, será el resultado de combinar un diagnóstico inequívoco junto con un conocimiento profundo de los mecanismos de persistencia viral y transmisión que actúan en el campo.

REFERENCIAS

- ALONSO FERNANDEZ, A., AUGÉ DE MELLO, P., GOMES, I., ROSENBERG, F. El uso del antígeno asociado a la infección viral (VIA) en la detección de ganado expuesto al virus de la fiebre aftosa. /The use of virus-infection-associated antigen (VIA) in the detection of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 17-18:17-22, 1975.
- ALONSO, A., GOMES, I., BAHNEMANN, H.G. La inducción de anticuerpos anti-VIAA en bovinos vacunados y revacunados con vacuna inactivada antiaftosa. /The induction of antibodies against VIAA in cattle vaccinated and revaccinated with inactivated foot-and-mouth disease vaccine. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 54:51-54, 1988.
- ALONSO, A., GOMES, M.P.D., MARTINS, M.A., SÖNDAHL, M.S. Detection of foot-and-mouth disease virus infection-associated antigen antibodies: comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay and agar gel immunodiffusion tests. *Prev. Vet. Med.*, 9:233-240, 1990.
- AMARAL-DOEL, C.M.F., OWEN, N.E., FERRIS, N.P., KITCHING, R.P., DOEL, T.R. Detection of foot-and-mouth disease viral sequences in clinical specimens and ethyleneimine-inactivated preparations by the polymerase chain reaction. *Vaccine*, 11:415-421, 1993.
- AUGÉ DE MELLO, P., HONIGMAN, M.N., FERNANDES, M.V., GOMES, I. Further information on the survival of modified foot-and-mouth disease virus in cattle. *Bull. Off. Int. Epizoot.*, 73:489-505, 1970.
- BERGMANN, I.E., AUGÉ DE MELLO, P., NETZERT, E., BECK, E., GOMES, I. Diagnosis of persistent aphthovirus infection and its differentiation from vaccination response in cattle by use of enzyme-linked immunoelectrotransfer blot analysis with bioengineered nonstructural viral antigens. *Am. J. Vet. Res.*, 54(6):825-831, 1993.
- BROWN, C.C., MEYER, R.F., OLANDER, H.J., HOUSE, C., MEBUS, C.A. A pathogenesis study of foot-and-mouth disease in cattle, using in situ hybridization. *Can. J. Vet. Res.*, 56:189-193, 1992.
- BURROWS, R. Studies on the carrier state of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus. *J. Hyg.*, 64:81-90, 1966.
- COSTA GIOMI, M.P., GOMES, I., TIRABOSCHI, B., AUGÉ DE MELLO, P., BERGMANN, I.E., SCODELLER, E.A., LA TORRE, J.L. Heterogeneity of the polyribocytidilic acid tract in aphthovirus: Changes in the size of the poly(C) of viruses recovered from persistently infected cattle. *Virology*, 162:58-64, 1988.
- COWAN, K.M., GRAVES, J.H. A third antigenic component associated with FMD infection. *Virology*, 30:528-540, 1966.

11. DAWE, P.S., PINTO, A.A. Antibody response to type specific and "virus infection associated" (VIA) antigens in cattle vaccinated with inactivated polyvalent FMD virus in Northern Malawi. *Br. Vet. J.*, 134:504-511, 1978.
12. DE LA TORRE, J.C., DAVILA, M., SOBRINO, F., ORTIN, J., DOMINGO, E. Establishment of cell lines persistently infected with foot-and-mouth disease virus. *Virology*, 145:24-35, 1985.
13. FELLOWES, O.N., SUTMÖLLER, P. Foot-and-mouth disease virus: Biological characteristics of virus from bovine carriers. *Arch. Ges. Virusforsch.*, 30:173-180, 1970.
14. GEBAUER, F., DE LA TORRE, J.C., GOMES, I., MATEU, M.G., BARAHONA, H., TIRABOSCHI, B., BERGMANN, I., AUGÉ DE MELLO, P., DOMINGO, E. Rapid selection of genetic and antigenic variants of foot-and-mouth disease virus during persistence in cattle. *J. Virol.*, 62:2041-2049, 1988.
15. HEDGER, R.S. The isolation and characterization of foot-and-mouth disease virus from clinically normal herds of cattle in Botswana. *J. Hyg.*, 66:27-36, 1968.
16. HÖFNER, M.C., CARPENTER, W.C., DONALDSON, A.I. Detection of foot-and-mouth disease virus RNA in clinical samples and cell culture isolates by amplification of the capsid coding region. *J. Virol. Meth.*, 42:53-62, 1993.
17. HOUSE, C., MEYER, R.F. The detection of foot-and-mouth disease virus in oesophageal-pharyngeal samples by a polymerase chain reaction technique. *J. Virol. Meth.*, 43:1-6, 1993.
18. KAADEN, O.R., EISSNER, G., BÖHM, H.O. Untersuchungen über Maul- und Klauenseuche (MKS)-Virusdauerasscheider bei vakzinierten und experimentell infizierten Rindern. *Zbl. Vet. Med. B.*, 17:485-496, 1970.
19. LAOR, O., TORGENSEN, H., YADIN, H., BECKER, Y. Detection of FMDV RNA amplified by the polymerase chain reaction (PCR). *J. Virol. Meth.*, 36:197-208, 1992.
20. LEEUW, P.W., VANBEKKUM, J.G., TIESSINK, J.W.A. Excretion of foot-and-mouth disease virus in esophageal-pharyngeal fluid and milk of cattle after intranasal infection. *J. Hyg.*, 81:415, 1978.
21. LOBO, C.A., HANSON, R.P., GUTIERREZ, A., BELTRAN, L.E. Serological detection of natural FMD infection in cattle and pigs. *Bull. Off. Int. Epizoot.*, 85:1075-1104, 1976.
22. LOCHER, F., TRATSCHIN, J.D., HOFMANN, M.A., KIHM, U. Rapid diagnosis of FMDV by PCR and characterization of virus isolates by nucleotide sequencing. Meeting Suiza 11.09.1992.
23. MALIRAT, V., AUGÉ DE MELLO, P., TIRABOSCHI, B., BECK, E., GOMES, I., BERGMANN, I.E. Genetic variation of foot-and-mouth disease virus during persistent infection in cattle. *Virus Research*, 34:31-48, 1994.
24. MARTINEZ-SALAS, E., ORTIN, J., DOMINGO, E. Sequence of the viral replicase gene from foot-and-mouth disease virus C1-Santa Pau (C-S8). *Gene*, 35:55-61, 1985.
25. McFARLANE, R.G., MOLITOR, T.W., VAKHARIA, V.N. The detection and differentiation of foot-and-mouth disease viruses using solid-phase nucleic acid hybridization. *J. Virol. Meth.*, 27:175-188, 1990.
26. McVICAR, J.W., SUTMÖLLER, P. FMD: The agar gel diffusion precipitin test for antibody to virus-infection associated (VIA) antigen as a tool for epizootiologic surveys. *Am. J. Epidemiol.*, 92:273-278, 1970.
27. MEYER, R.F., BROWN, C.C., HOUSE, C., HOUSE, J.A., MOLITOR, T.W. Rapid and sensitive detection of foot-and-mouth disease virus in tissues by enzymatic RNA amplification of the polymerase gene. *J. Virol. Meth.*, 34:113-226, 1991.
28. MULLIS, K.B., FALDONA, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*, 155:335-350, 1987.
29. NEITZERT, E., BECK, E., AUGÉ DE MELLO, P., GOMES, I., BERGMANN, I.E. 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. *Virology*, 184:799-804, 1991.
30. PINTO, A.A., GARLAND, A.J.M. Immune response to virus-infection-associated (VIA) antigen in cattle repeatedly vaccinated with foot-and-mouth disease virus inactivated by formalin or acetylenimine. *J. Hyg.*, 82:41-50, 1979.
31. POLATNICK, J. Isolation of a foot-and-mouth disease polyuridylic acid polymerase and its inhibition by antibody. *J. Virol.*, 33:774-779, 1980.
32. POLATNICK, J., ARLINGHAUS, R.A. Foot-and-mouth disease virus-induced RNA polymerase in baby hamster kidney cells. *Virology*, 31:601-608, 1967.
33. RODRIGUEZ, A., MARTINEZ-SALAS, E., DOPAZO, J., DAVILA, M., SAIZ, J.C., SOBRINO, F. Primer design for specific diagnosis by PCR of highly variable RNA viruses: typing of foot-and-mouth disease virus. *Virology*, 189:363-367, 1992.

32. POLATNICK, J., ARLINGHAUS, R.A. Foot-and-mouth disease virus-induced RNA polymerase in baby hamster kidney cells. *Virology*, 31:601-608, 1967.
33. RODRIGUEZ, A., MARTINEZ-SALAS, E., DOPAZO, J., DAVILA, M., SAIZ, J.C., SOBRINO, F. Primer design for specific diagnosis by PCR of highly variable RNA viruses: typing of foot-and-mouth disease virus. *Virology*, 189:363-367, 1992.
34. ROSSI, M.S., SADIR, A.M., SCHUDEL, A.A., PALMA, E.L. Detection of foot-and-mouth disease virus with DNA probes in bovine esophageal-pharyngeal fluids. *Arch. Virol.*, 99:67-74, 1988.
35. STRAVER, P.J., BOOL, P.H., CLAESSENS, A.M.J.M., VAN BEKKUM, J.G. Some properties of carrier strains of foot-and-mouth disease virus. *Arch. Ges. Virusforsch.*, 29:113-126, 1970.
36. STRAVER, P.J., VAN BEKKUM, J.G. Plaque production by carrier strains of foot-and-mouth disease virus in BHK monolayers incubated at different temperatures. *Arch. Ges. Virusforsch.*, 37:12-18, 1972.
37. STREBEL, K., BECK, E., STROHMAIER, K., SCHALLER, H. Characterization of foot-and-mouth disease virus gene products with antisera against bacterially synthesized fusion proteins. *J. Virol.*, 57:983-991, 1986.
38. SUTMÖLLER, P., COTTRAL, G.E. Improved techniques for the detection of FMDV in carrier cattle. *Arch. Ges. Virusforsch.*, 21(2):170-177, 1967.
39. SUTMÖLLER, P., GAGGERO, A. Foot-and-mouth disease carriers. *Vet. Rec.*, 77:968-969, 1965.
40. SUTMÖLLER, P., McVICAR, J.W., COTTRAL, G.E. The epizootiological importance of foot-and-mouth disease carriers. I. Experimentally produced foot-and-mouth disease carriers in susceptible and immune cattle. *Arch. Ges. Virusforsch.*, 23:227-235, 1968.
41. VAN BEKKUM, J.G., FRENKEL, H.S., FREDERIKS, H.H.J., FRENKEL, S. Observation on the carrier state of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus. *Tijdschr. Diergeneeskd.*, 84:1159-1164, 1959.

MOLECULAR APPROACHES TO LABORATORY DIAGNOSIS OF PERSISTENT FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS INFECTION: A REVIEW

I.E. BERGMANN, V. MALIRAT

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

SUMMARY. New approaches for improving the methods for identification of persistent foot-and-mouth disease (FMD) viral infections are described. They consisted of detection of specific FMDV genomic fragments in oesophageal-pharyngeal samples by hybridization techniques, with or without their prior amplification, using the polymerase chain reaction. Also, for the identification of FMDV-specific antibodies, indicative of viral replication, the development of a highly sensitive and specific immunoenzymatic method based on the use of purified FMDV recombinant nonstructural antigens as serological probes, was undertaken.

The ability of foot-and-mouth disease virus (FMDV) to establish subclinical infection in certain hosts, such as cattle and other ruminants, (5, 8, 15, 18, 39-41) is of great significance to programs of prevention, control and eradication of FMD. Accordingly, detection of replication of FMDV in animals not manifesting signs of disease is as relevant as is diagnosis of acute infection.

Identification of animals with persistent FMDV infection includes, currently, screening for antibodies against the viral infection-associated antigen(s) (VIAA) using the immunodiffusion in agarose gel (IDAG) test (1, 10, 11, 21, 26, 30), and cell culture isolation of virus from oesophageal-pharyngeal (OP) fluid (8, 20, 36, 38). However, these methods do not always lead to conclusive results. As established experimentally, identification of VIAA antibodies does not always correlate with recovery of virus from OP fluid. Moreover, detection of the persistent state during the late phases of infection was only rarely possible. Only occasion-

ally was virus recovered from OP samples, and the low test sensitivity of the IDAG did not allow for identification of VIAA antibodies (6, 14).

Prevailing programs for the hemispheric eradication of FMD, based on regionalization by ecosystems and trade movements, have among their main objectives the identification, preservation and expansion of disease-free regions. The rapid progress of these programs, especially in the Rio de la Plata basin, emphasizes the need for rapid and unequivocal methods to demonstrate absence of viral activity with greater certainty.

Molecular genetic techniques have provided powerful tools to define new procedures for diagnosis of suspected subclinical infection. This review will focus on the approaches attempted to date for improving the methods for identification of persistent FMDV infections.

MOLECULAR CLONING OF REVERSE-TRANSCRIBED FMDV cDNA

One major requisite for the introduction of new diagnostic tools for FMDV subclinical infection was the molecular cloning of the single-stranded genomic RNA of the virus. Basically, this

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

technique consists of inserting a fragment of foreign DNA into a bacterial plasmid (piece of DNA found outside the bacterial chromosome) that contains a gene for antibiotic resistance, introducing the plasmid into bacteria, and then selecting with antibiotics for those bacterial cells that become antibiotic-resistant. Bacteria containing the plasmid carrying the foreign DNA, in our case FMDV, are easy to identify if the latter is cloned in the middle of a second antibiotic resis-

tance gene, destroying the gene activity. These plasmids will confer resistance to one antibiotic but not to the second, and thus allow recognition of bacteria containing the recombinant plasmid (figure 1).

To clone FMDV RNA sequences, a complementary DNA (cDNA) copy of the RNA must first be synthesized. Once the FMDV cDNA sequence of interest has been cloned into a plasmid, large amounts of the plasmid are grown in bacteria and

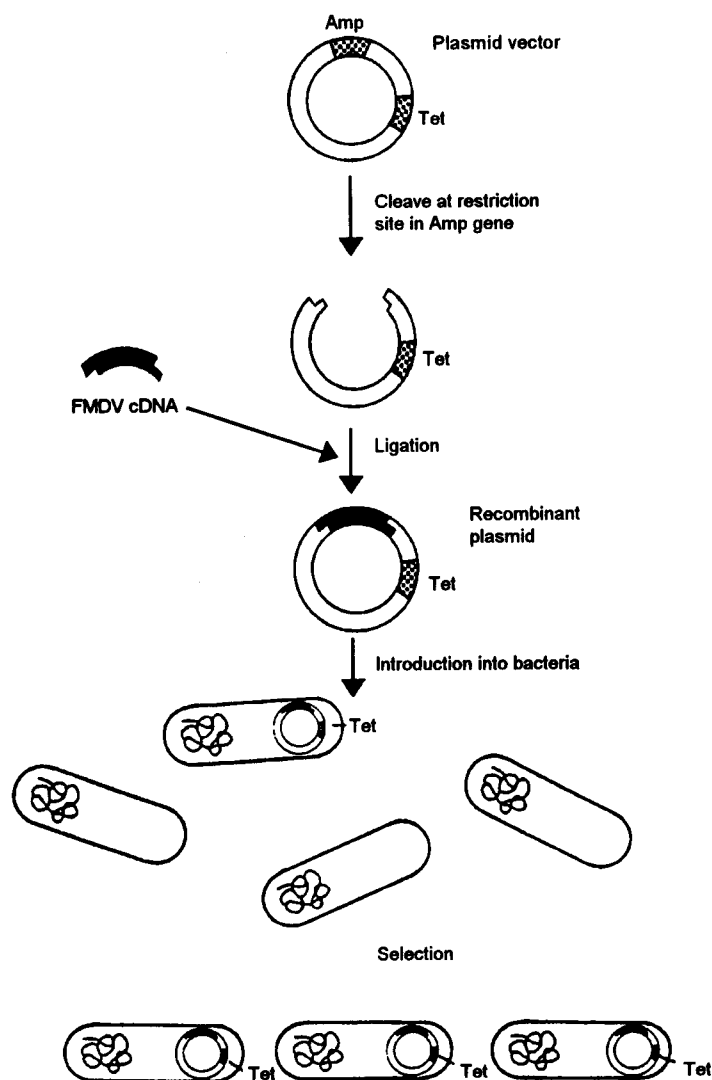


Figure 1. Schematic representation of cloning DNA in a plasmid.

subsequently purified from the chromosomal DNA. This provides abundant supplies of cDNA, for use as a molecular probe to detect FMDV genomic sequences, in hybridization tests. Moreover, the collection of the different cloned FMDV cDNA fragments, coding for specific viral proteins, can be inserted into bacterial expression plasmids, so that the selected protein can be produced, and purified from the bacterial lysate. Thus, bioengineered serological probes can be obtained.

As outlined in figure 2, the single-stranded RNA of the FMDV genome was cloned into the plasmid pBR322. Clones covering the whole coding region of the genome, were obtained.

CLONED FMDV cDNA AS A DIAGNOSTIC REAGENT FOR THE DETECTION OF FMDV BY NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION TECHNIQUES

This detection method is based upon the ability of complementary strands of nucleic acids, whether DNA-DNA, DNA-RNA, or RNA-RNA, to anneal and form a double-stranded molecule. This hybrid structure comprises two complementary polynucleotide strands bound by hydrogen bonds between complementary base pairs. The duplex is stable under normal physiological conditions, but it will dissociate (denature) into its component single strands when heated or exposed to pH extremes.

For detection of FMDV, a specific denatured single-stranded FMDV cDNA probe is used to hybridize to complementary viral RNA. The reaction takes place directly in specimens (*in situ* hybridization), or after binding the RNA to solid phases (dot-blot or slot-blot). Probes are typically labeled with either a radionuclide or biotin in order to permit detection of the specific hybrids (figure 3).

For use as a tool for the specific detection of FMDV genomic sequences in OP fluid of presumably infected animals, a major requisite is the demonstration that the radioactively labeled cloned viral cDNA probe hybridizes specifically to the viral nucleic acid, and not to total RNA from the OP sample. As shown in the example given in

figure 4, when total RNA, extracted from OP samples of experimentally FMDV-infected cattle, was dotted on nitrocellulose, and hybridized with ³²P-labeled cloned FMDV cDNA, specific hybridization was found only after infection.

Although hybridization methods are not as sensitive as virus-recovery procedures (25,34), several samples corresponding to advanced stages of infection, positive by dot-blot, were negative when assayed by infectivity in cell culture (example in figure 4). These results are consistent with those reported by Rossi et al. (34) and suggest that during late persistence, large amounts of non-infectious progeny may occur. Thus, nucleic acid hybridization appears especially useful since it detects even inactive or incomplete viral genomes which could, under adequate circumstances, lead to infective virus.

Furthermore, this method is not affected by the numerous difficulties encountered with the current detection based on cell culture isolation of virus from OP fluid. For example, viral recovery in cultures may be impaired by the quality and amount of material obtained, as well as by antibodies remaining in the samples despite the TTE treatment (38). Moreover, variants selected upon replication of the virus in the animal (9,13,14,23,35,36) may grow scarcely and in a limited range of cell cultures. Another limitation of the cell culture method is that a negative result could require as long as 14 days for confirmation, while if viral replication occurs, the virus must be identified by supplementary tests.

An additional advantage of the nucleic acid hybridization approach is that detection of different FMDV serotypes is possible by using just one cloned cDNA as a probe. The molecular basis for this genus-specific hybridization is the high degree of nucleic acid sequence homology among the different serotypes, in genomic regions corresponding to proteins such as the viral polymerase (24). This broad detection spectrum greatly facilitates the screening of suspected animals. Furthermore, if needed, typing of the implicated virus can be carried out simultaneously by using cDNA probes from individual serotypes corresponding to structural protein VP1 (25).

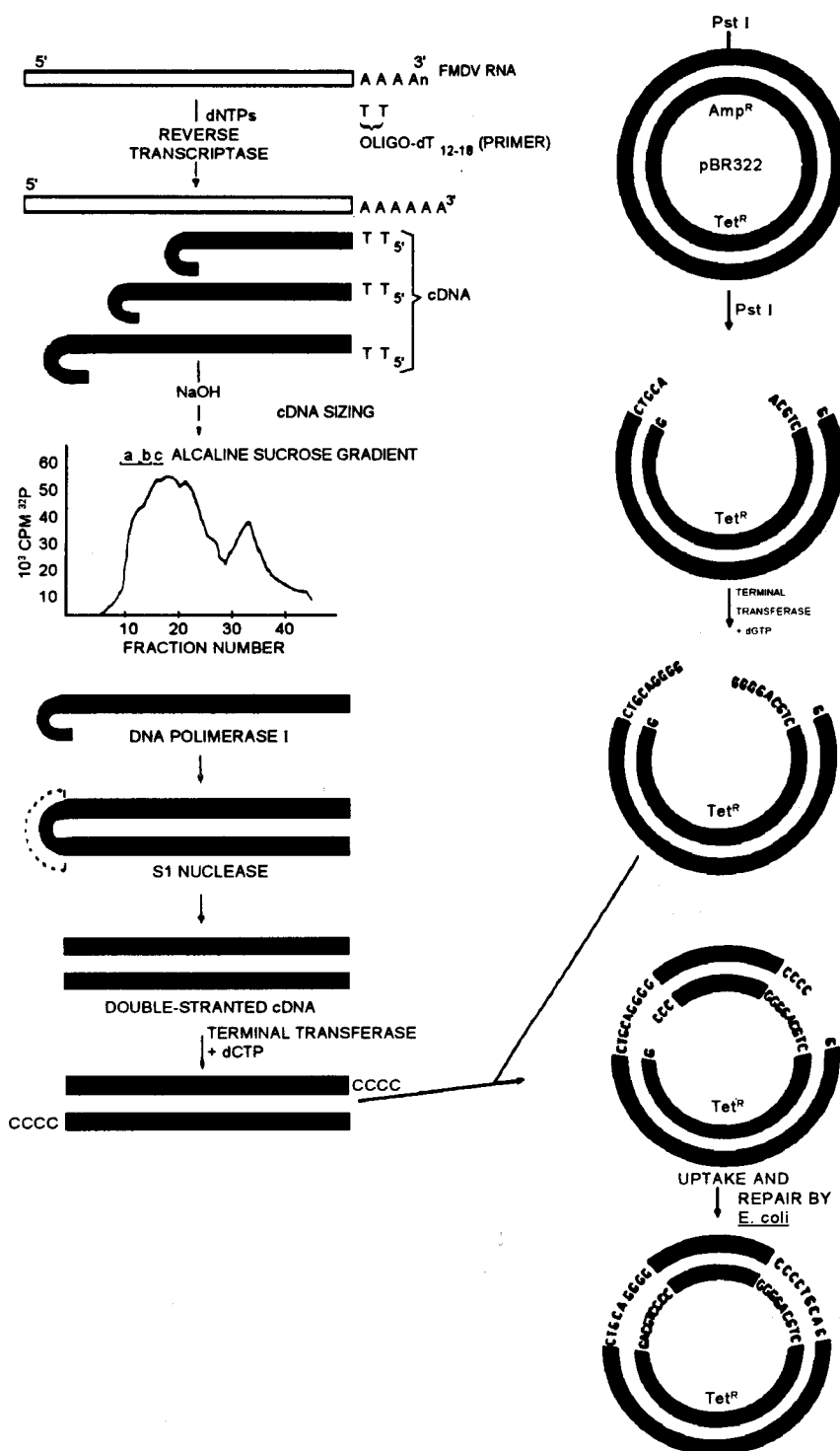


Figure 2. Cloning strategy of FMDV cDNA. The polyadenylated purified RNA served as a template for oligo(dT)₁₂₋₁₈-primed first-strand complementary DNA (cDNA) synthesis, using reverse transcriptase. The RNA strand of the RNA-cDNA hybrid was alkali-digested and the cDNA fractionated on an alkaline sucrose gradient into three pools of different size a (2000-4000 bases), b (4000-6000 bases), and c (6000-8000 bases). Second strand synthesis from each of the different pools was mediated by DNA polymerase I and limited concentrations of S1 nuclease were added to cleave the resulting hairpin structure. Homopolymer tails of 10-15 residues of dCMP were added directly to double-stranded cDNA by using terminal deoxynucleotidyl transferase. Plasmid vector pBR322 (containing a tetracycline- and ampicillin-resistance gene) was linearized at its ampicillin-resistance gene by digestion with Pst I, tailed with dGMP, hybridized to the oligo(dC)-tailed double-stranded cDNA, and used to transform *Escherichia coli* HB101. Tetracycline-resistant and ampicillin-sensitive clones were selected and further screened by colony hybridization. Amp^R: ampicillin-resistant site. Tet^R: tetracycline-resistant site.

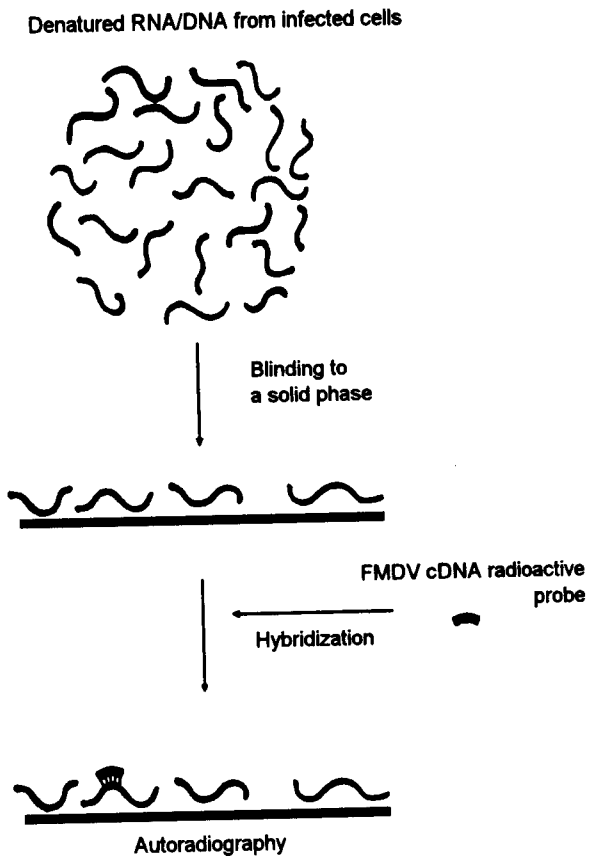


Figure 3. Schematic representation of the hybridization of nitrocellulose bound RNA to a specific cDNA probe.

Direct hybridization in fixed tissues is also a worthwhile tool especially for studies of viral pathogenicity (7), since it permits the direct identification of the virus-infected target cells and an estimate of the proportion of cells carrying the viral genome within a tissue section.

AMPLIFICATION OF FMDV-SPECIFIC GENOMIC RNA SEGMENTS

As mentioned above, nucleic acid hybridization assays are not as sensitive as virus-isolation procedures. This limitation can now be overcome

by first amplifying the material to be analyzed using the polymerase chain reaction (PCR) method (28). In this technique, double-stranded DNA is heat-denatured and two oligonucleotide primers are hybridized to complementary sequences on either side of the template. These primers, that flank the region to be amplified in the target DNA, are extended by using the thermal resistant Taq DNA polymerase, thus doubling the sequence of interest. Since primer extension products can serve as templates in the next cycle, there is an exponential accumulation of specific fragments, whose termini are defined by the 5' ends of the primers. Thus 20 cycles can yield about one million-fold amplification (figure 5). The amplified material can then be visualized by agarose gel electrophoresis and further characterized.

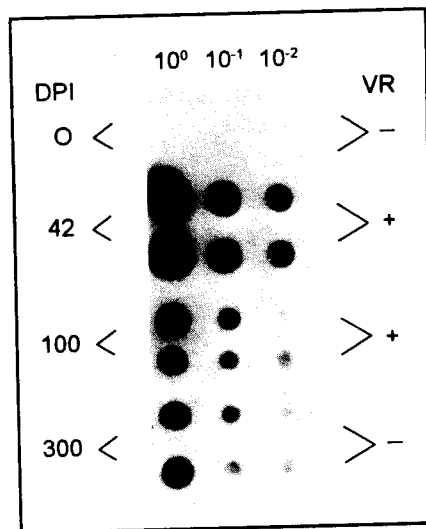


Figure 4. Examples of hybridization of cloned FMDV cDNA to total RNA from OP fluid from experimentally FMDV-infected cattle. Ten-fold dilutions of nucleic acid from the OP region from cattle, before or after experimental FMDV-infection, were dotted in duplicate on nylon filters, and hybridized with ³²P-labeled cDNA fragments corresponding to the region from 6.3 to 7.8 kilobases of the FMDV genome. Autoradiographic exposure was at -80°C for 18 h. DPI, days postinoculation; VR, virus recovery in cell culture.

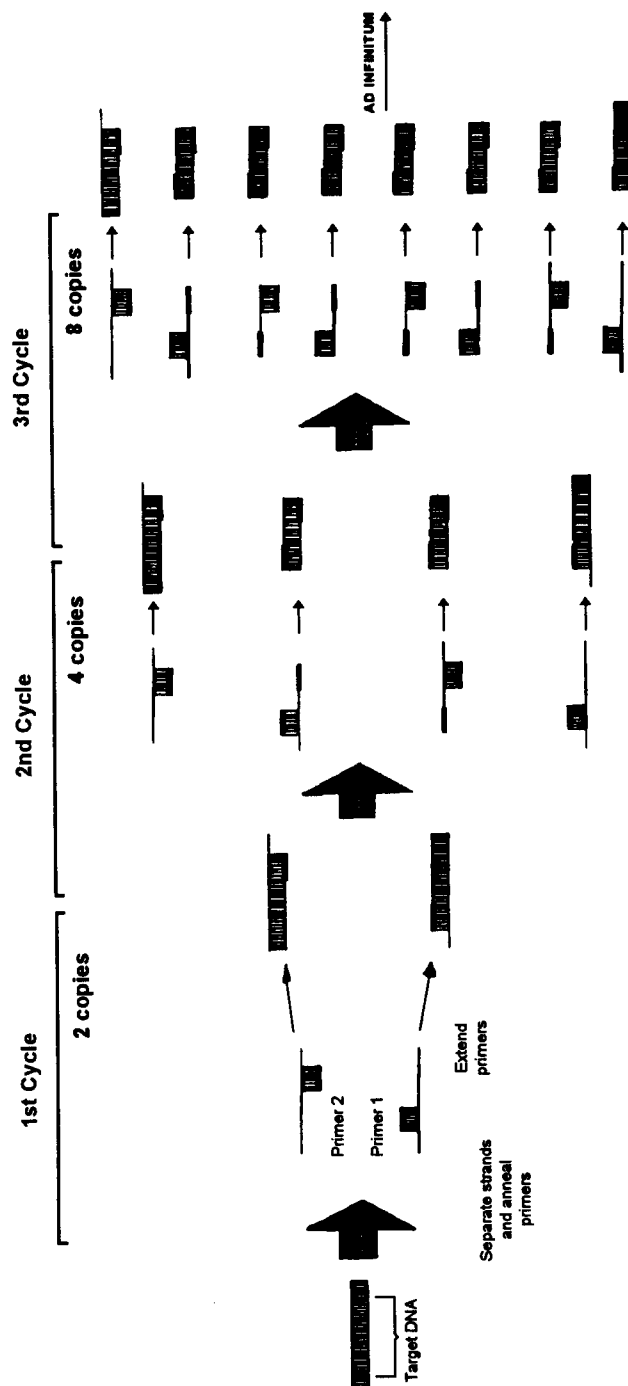


Figure 5. Schematic representation of the polymerase chain reaction (PCR) method.

For the detection of viral RNA it is necessary to obtain first a cDNA copy by reverse transcription, which is then used as template DNA in the PCR reaction.

Reverse transcription and amplification from FMDV-infected cell cultures of RNA segments of 850 bases covering the whole VP₁ region, and of 2070 bases covering the genomic region coding for the capsid polypeptides VP₃, VP₂ and VP₁, resulted in a prominent band of the expected size (figure 6). The primers selected, corresponded to conserved regions of the FMDV genome, so that amplification of FMDV serotypes O, A and C was possible. The specificity of the amplified material was confirmed by restriction enzyme analysis (data not shown). Characterization may also be carried out by hybridization using an appropriate probe, and by sequencing of amplification products (19,22,27). By using serotype-specific primers for amplification, type-specific identification has been attempted (33).

In comparison with the infectivity assays, the PCR was found to be generally 10⁴ times more sensitive (4). This was partly attributed to the ability of the PCR to amplify from non-infectious RNA.

Adaptation of the PCR technique for amplification and detection of FMDV nucleic acids from OP samples is an important requirement if the method is addressed as a tool for identification of animals with subclinical infection. In this regard, direct amplification from OP samples, thus omitting the need to purify the RNA, has been described (16). Other studies, however, report the presence of inhibitors in the OP fluid, even after RNA purification, which compromises the high sensitivity of this procedure (4,17). Clearly, this could limit the diagnostic application of the PCR. Studies are being conducted to clarify this point.

A great advantage of this rapid and sensitive method for the detection of FMDV, is that nucleotide sequence information can be obtained directly from clinical samples without the prior need for virus amplification in cell culture. This avoids the possibility of *in vitro* induced

selection and modification of viral populations. Due to potential inhibitors in OP samples, this advantage may not always be helpful in the characterization of persistent viruses. However, it does apply to the acute stage of FMDV infection, during which abundance of virus can be obtained from epithelial tissues of the tongue and interdental cleft. Thus, VP₁ PCR amplification in combination with direct sequencing of the amplified DNA provides a promising method for molecular epidemiological studies.

NEW TOOLS AND REAGENTS TO DETECT FMDV ANTIBODIES IN SERA OF PERSISTENTLY FMDV-INFECTED ANIMALS

A major limitation encountered using VIAA as a serological probe to detect antibodies against FMDV infection-associated antigens is the need to produce it in cell culture, for example, baby hamster kidney (BHK). Such an antigen (a) is expensive, (b) has a limited shelf-life, (c) needs to be standardized with each new batch, and (d) poten-

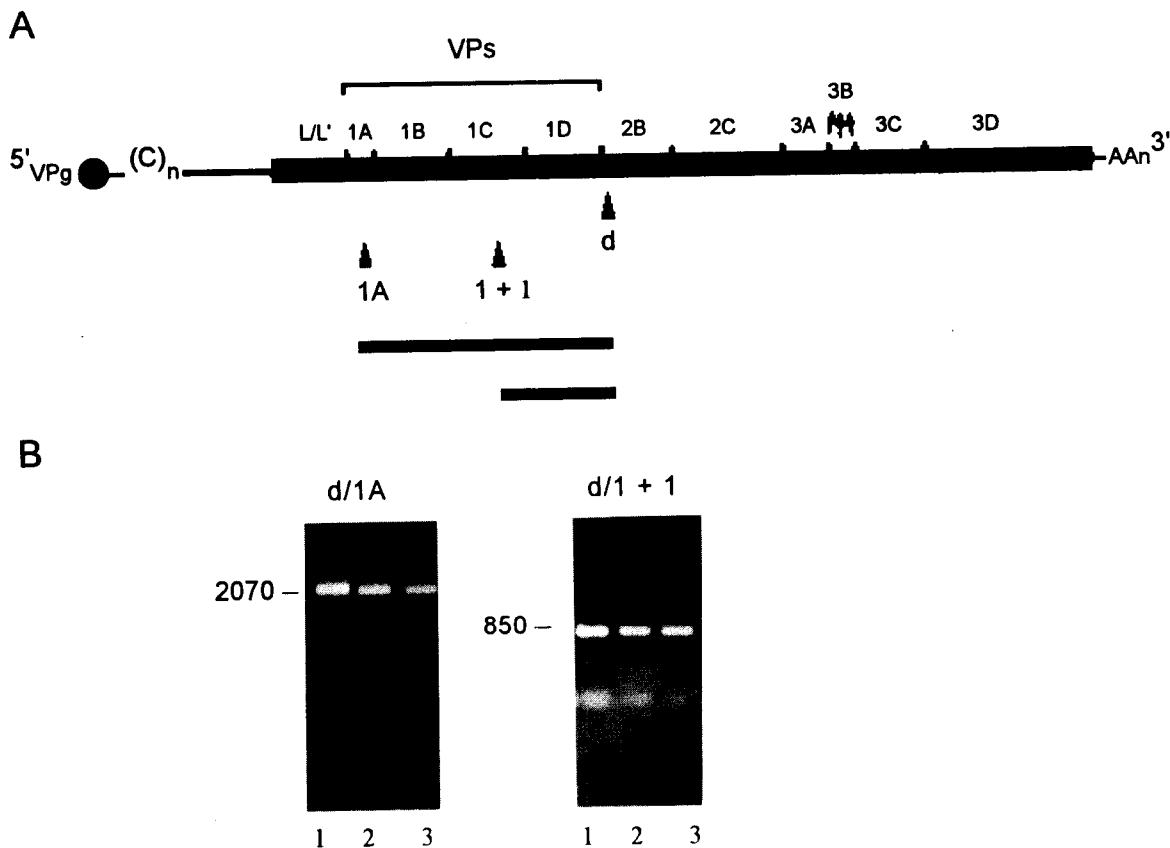


Figure 6. A. Schematic representation of the viral capsid-coding region (VPs) which was targeted for enzymatic amplification by PCR. The position of primers used in the PCR are shown as filled arrows. Primer d has sequences complementary to the RNA, whereas primers 1A and 1+1 have the same sequences and polarity than the RNA. Black bars indicate the positions and lengths of the amplified fragments. **B.** 1% agarose gels stained with ethidium bromide of 1/30th PCR reaction products corresponding to the cDNAs from virus (1) O₁, Campos Br-1/58, (2) A₂₄, Cruzeiro Br-1/55 and (3) C₃, Indaial Br-1/71. The different combination of primers used and the expected size of the PCR products are indicated.

tially, contains antigens which may be recognized by the sera from animals immunized with vaccines prepared from cell culture systems which may lead to false positive tests. In fact, positive results yielded by IDAG for postvaccination sera have been reported (2,11,30). This problem has been accentuated when a more sensitive technique such as ELISA was attempted (3).

Replacement of the VIAA by nonstructural antigens expressed in bacteria has considerable attraction. Since the proteins are obtained from genomic fragments that code specifically for each one of them, their expression provides molecularly defined products. This eliminates potential contamination with structural proteins or BHK polypeptides, which could lead to positive results with sera from vaccinated cattle. The facility with which large amounts of material can be obtained, enables easy purification to homogeneity, so that highly sensitive immunoenzymatic methods can be employed without compromising the specificity of the reactions. In addition, bacterial cultures require less space, time and effort than eukaryotic cell cultures, and are considerably less expensive. Their absolute safety is particularly relevant for FMD-free regions because in no step of the antigen production process is infective or noninfective FMDV involved. This eliminates the need for expensive high security laboratory units. Finally, serological probes of any nonstructural polypeptide can be easily prepared through DNA recombinant techniques. Thus, the most suitable antigens of potential diagnostic significance can be identified by studying the antibody response of the host to the various proteins during different stages of persistence.

USE OF A BACTERIALLY-EXPRESSED RNA POLYMERASE IN ENZYME-LINKED IMMUNOELECTROTRANSFER BLOT (EITB)

Since a close relation between the VIAA and the viral RNA polymerase (3D) had been established (31,32), attempts were made to express the latter in bacteria.

To obtain the most adequate antigen for use as a serological probe, an expression vector was constructed which included DNA coding for the complete 3D polymerase (29). This vector carried the inducible pL promoter of bacteriophage Lambda, upstream of a consensus Shine Dalgarno sequence. The expressed polymerase contained only one additional amino acid, the N-terminal methionine, and was purified from the soluble fraction of the bacterial extracts by chromatography over a phosphocellulose column, followed by a poly(U)-Sepharose column. The purified 3D protein was then used in an EITB assay, to identify the presence of anti-polymerase antibodies in sera of experimentally persistently infected animals (29).

The EITB combines the resolution of gel electrophoresis with the sensitivity and specificity of immunoenzymatic reactions. The unlabeled antigen is electrophoretically resolved and transferred to nitrocellulose membrane. After blocking non-specific binding sites on the membrane, the immunoenzymatic assay is carried out by incubating the unlabeled serum sample, followed by an enzyme-labeled secondary antibody that functions as a detection reagent.

As shown in the examples given in figure 7, antibody binding to this 3D antigen occurred throughout the persistent state, being maintained even at late stages. At this time, all reactions by the conventional IDAG test were negative, and virus from OP samples was recovered only occasionally. The high specificity of the EITB was indicated by the lack of reactivity in sera from cattle without previous exposure to FMDV or viral antigens, including samples from animals infected with a variety of bovine viruses (6).

In spite of its greater sensitivity, EITB eliminated a considerable number of positive results generated by IDAG with postvaccination sera (6). Considering that the VIAA used was only purified partially from BHK-infected cells, the IDAG results suggested that traces of FMDV-capsid polypeptides or BHK antigens may have been recognized by sera from cattle inoculated with BHK-produced vaccines, thus leading to false positive results.

However, the presence of residual polymerase

in some vaccine preparations was suggested by the occasional reactivity of the expressed 3D with postvaccination sera. Attempts to overcome this limitation have included the use of additional recombinant nonstructural viral antigens as described in the following section.

USE OF BACTERIALLY-EXPRESSED NONSTRUCTURAL ANTIGENS 3A, 3B, 2C AND 3ABC IN EITB

To obtain the recombinant DNA-derived nonstructural FMDV antigens 3A, 3B, 2C and 3ABC, defined regions of the FMDV genome fused to the N-terminal part of the MS2-polymerase gene were expressed in bacteria, under the control of the inducible lambda pL promoter (37).

As with the expressed polypeptide 3D, antibody binding to the aforementioned antigens was positive, even at the late stages of persistent infections (figure 7). Again, reactivity was not detectable with sera from FMD-free regions, including sera with high antibody titers to various bovine RNA and DNA viruses.

Postvaccination sera which were positive in IDAG using VIAA, including those which showed EITB reactivity with the recombinant polymerase, gave no detectable reactions with the antigens 3A, 3B, 2C and 3ABC. Thus, it seems that the use of either the polymerase alone or the traditionally used VIAA, is not adequate to distinguish whether seropositivity of field samples may be attributable to infection or vaccination. In fact, although the EITB is considerably more sensitive, use of the

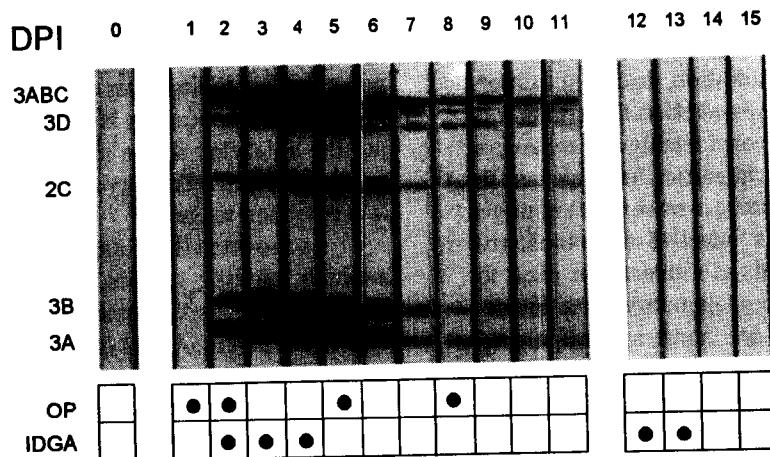


Figure 7. Serum antibody response of infected cattle to recombinant antigens 3A, 3B, 2C, 3D, and 3ABC by EITB. Viral isolation (OP) from OP fluids or positive-VIAA determination (IDAG) is indicated by a dot. 7ng/mm of each of the purified bacterially expressed nonstructural antigens, obtained as described in (29) were separated on 12.5% SDS-PAGE. Electrophoretic transfer to nitrocellulose and the immunoassay were performed as described (29). Sera from infected cattle were tested at various days after infection (DPI). Lane 1, DPI 7; Lane 2, DPI 42; Lane 3, DPI 154; Lane 4, DPI 231; Lane 5, DPI 280; Lane 6, DPI 315; Lane 7, DPI 448; Lane 8, DPI 546; Lane 9, DPI 602; Lane 10, DPI 644; Lane 11, DPI 742. Control strips included FMDV-negative serum from the bovid before infection (lane 0); revaccinated cattle at 30 days after the first vaccination, lanes 12 and 13; FMD-free regions, lanes 14 and 15.

IDAG led to a substantial overestimation of persistently infected cattle from endemic regions, possibly due to the reactivity of postvaccination samples. This clearly indicated the relevance of using selected nonstructural FMDV antigens to identify sera from infected animals unambiguously (6).

Another important feature of this technique, is that infection with any serotype of FMDV can be detected by a single serological assay.

The above studies demonstrated that despite the high sensitivity of EITB to identify antibodies remaining after infection, it is highly reliable in eliminating false positives detected by IDAG. Therefore, since the EITB method is capable of identifying absence of viral activity, its application would be particularly important in areas of South America where eradication programs are in progress, particularly in regions close to international recognition as FMD-free, especially during the last stages of systematic vaccination and during the early phases after suspension of vaccination. Also, a large number of IDAG false-negative results should be avoided during import/export testing, substantially simplifying this process.

CONCLUSIONS AND OUTLOOK

Although persistent FMDV infections are widely recognized, neither the incidence in the field nor its true duration have been established accurately. The reason for this insufficient knowledge in these important subjects, is the difficulty of obtaining an unequivocal diagnosis of such infections.

Molecular techniques have allowed significant improvements for diagnosis of FMDV persistence. In fact, the PCR can reach a sensitivity equivalent to 10^{-2} TCID₅₀ (4). In addition, the development of immunoenzymatic approaches together with the use of purified bioengineered serological probes allow for a highly sensitive and specific detection of antibodies in sera from late persistently infected animals.

The application of these highly sensitive and specific methods should be of enormous importance to identify FMD-free areas, for import/ex-

port testing, and as an epidemiological tool to establish the incidence of FMDV persistence in the field. However, accurate interpretation of these improved methods of detection of either viral genomic material or virus specific antibodies should be accompanied by a deep understanding of the molecular and immunological mechanisms that take place during the persistent state in the animal.

In dealing with immunoenzymatic approaches it should be always kept in mind that the demonstration of antiviral antibodies indicates past, but not necessarily ongoing viral replication. In fact, most seropositive, late persistently FMDV-infected animals, did not yield virus as measured by infectivity tests (figure 7) (29). However, positive hybridization results have been obtained among these samples (figure 4). Presumably, this is because FMDV persistence may result in the presence of a high ratio of non-infectious viral mutants or incomplete viral genomes in OP fluids, as has been demonstrated in persistently FMDV-infected cell cultures (12). Accordingly, this could explain the common failure to isolate infectious virus from OP fluids during the late stages of the persistent state (14, 23, 29).

Recombinant DNA techniques have not only contributed significantly to an improved diagnosis of FMDV-subclinical infection, but have allowed an important breakthrough in the study of the mechanisms taking place during viral replication in persistently infected cattle. Such research is currently in a very dynamic phase.

Accurate interpretation of the epidemiological significance of a persistent state in the field will be the result of combining an unequivocal diagnosis, with deep knowledge of the mechanisms of viral persistence and of transmission acting in the field.

REFERENCES

1. ALONSO FERNANDEZ, A., AUGÉ DE MELLO, P., GOMES, I., ROSENBERG, F. El uso del antígeno asociado a la infección viral (VIA) en la detección de ganado expuesto al virus de la fiebre aftosa. / The use of virus-infection-associated antigen (VIA) in the detection of cattle exposed to

- foot-and-mouth disease virus. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 17-18:17-22, 1975.
2. ALONSO, A., GOMES, I., BAHNEMANN, H.G. La inducción de anticuerpos anti-VIAA en bovinos vacunados y revacunados con vacuna inactivada antiaftosa./The induction of antibodies against VIAA in cattle vaccinated and revaccinated with inactivated foot-and-mouth disease vaccine. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 54:51-54, 1988.
 3. ALONSO, A., GOMES, M.P.D., MARTINS, M.A., SÖNDAHL, M.S. Detection of foot-and-mouth disease virus infection-associated antigen antibodies: comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay and agar gel immunodiffusion tests. *Prev. Vet. Med.*, 9:233-240, 1990.
 4. AMARAL-DOEL, C.M.F., OWEN, N.E., FERRIS, N.P., KITCHING, R.P., DOEL, T.R. Detection of foot-and-mouth disease viral sequences in clinical specimens and ethyleneimine-inactivated preparations by the polymerase chain reaction. *Vaccine*, 11:415-421, 1993.
 5. AUGÉ DE MELLO, P., HONIGMAN, M.N., FERNANDES, M.V., GOMES, I. Further information on the survival of modified foot-and-mouth disease virus in cattle. *Bull. Off. Int. Epizoot.*, 73:489-505, 1970.
 6. BERGMANN, I.E., AUGÉ DE MELLO, P., NEITZERT, E., BECK, E., GOMES, I. Diagnosis of persistent aphthovirus infection and its differentiation from vaccination response in cattle by use of enzyme-linked immunoelectrotransfer blot analysis with bioengineered nonstructural viral antigens. *Am. J. Vet. Res.*, 54(6):825-831, 1993.
 7. BROWN, C.C., MEYER, R.F., OLANDER, H.J., HOUSE, C., MEBUS, C.A. A pathogenesis study of foot-and-mouth disease in cattle, using in situ hybridization. *Can. J. Vet. Res.*, 56:189-193, 1992.
 8. BURROWS, R. Studies on the carrier state of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus. *J. Hyg.*, 64:81-90, 1966.
 9. COSTA GIOMI, M.P., GOMES, I., TIRABOSCHI, B., AUGÉ DE MELLO, P., BERGMANN, I.E., SCODELLER, E.A., LA TORRE, J.L. Heterogeneity of the polyribocytidilic acid tract in aphthovirus: Changes in the size of the poly(C) of viruses recovered from persistently infected cattle. *Virology*, 162:58-64, 1988.
 10. COWAN, K.M., GRAVES, J.H. A third antigenic component associated with FMD infection. *Virology*, 30:528-540, 1966.
 11. DAWE, P.S., PINTO, A.A. Antibody response to type specific and "virus infection associated" (VIA) antigens in cattle vaccinated with inactivated polyvalent FMD virus in Northern Malawi. *Br. Vet. J.*, 134:504-511, 1978.
 12. DE LA TORRE, J.C., DAVILA, M., SOBRINO, F., ORTIN, J., DOMINGO, E. Establishment of cell lines persistently infected with foot-and-mouth disease virus. *Virology*, 145:24-35, 1985.
 13. FELLOWES, O.N., SUTMÖLLER, P. Foot-and-mouth disease virus: Biological characteristics of virus from bovine carriers. *Arch. Ges. Virusforsch.*, 30:173-180, 1970.
 14. GEBAUER, F., DE LA TORRE, J.C., GOMES, I., MATEU, M.G., BARAHONA, H., TIRABOSCHI, B., BERGMANN, I., AUGÉ DE MELLO, P., DOMINGO, E. Rapid selection of genetic and antigenic variants of foot-and-mouth disease virus during persistence in cattle. *J. Virol.*, 62:2041-2049, 1988.
 15. HEDGER, R.S. The isolation and characterization of foot-and-mouth disease virus from clinically normal herds of cattle in Botswana. *J. Hyg.*, 66:27-36, 1968.
 16. HÖFNER, M.C., CARPENTER, W.C., DONALDSON, A.I. Detection of foot-and-mouth disease virus RNA in clinical samples and cell culture isolates by amplification of the capsid coding region. *J. Virol. Meth.*, 42:53-62, 1993.
 17. HOUSE, C., MEYER, R.F. The detection of foot-and-mouth disease virus in oesophageal-pharyngeal samples by a polymerase chain reaction technique. *J. Virol. Meth.*, 43:1-6, 1993.
 18. KAADEN, O.R., EISSNER, G., BÖHM, H.O. Untersuchungen über Maul-und Klauenseuche (MKS)-Virusdauer ausscheider bei vakzinierten und experimentell infizierten Rindern. *Zbl. Vet. Med. B.*, 17:485-496, 1970.
 19. LAOR, O., TORGENSEN, H., YADIN, H., BECKER, Y. Detection of FMDV RNA amplified by the polymerase chain reaction (PCR). *J. Virol. Meth.*, 36:197-208, 1992.
 20. LEEUW, P.W., VAN BEKKUM, J.G., TIESSINK, J.W.A. Excretion of foot-and-mouth disease virus in esophageal-pharyngeal fluid and milk of cattle after intranasal infection. *J. Hyg.*, 81:415, 1978.
 21. LOBO, C.A., HANSON, R.P., GUTIERREZ, A., BELTRAN, L.E. Serological detection of natural FMD infection in cattle and pigs. *Bull. Off. Int. Epizoot.*, 85:1075-1104, 1976.
 22. LOCHER, F., TRATSCHIN, J.D., HOFMANN, M.A., KIHM, U. Rapid diagnosis of FMDV by

- PCR and characterization of virus isolates by nucleotide sequencing. Meeting Suiza 11.09.1992.
23. MALIRAT, V., AUGÉ DE MELLO, P., TIRABOSCHI, B., BECK, E., GOMES, I., BERGMANN, I.E. Genetic variation of foot-and-mouth disease virus during persistent infection in cattle. *Virus Research*, 34:31-48, 1994.
 24. MARTINEZ-SALAS, E., ORTIN, J., DOMÍNGO, E. Sequence of the viral replicase gene from foot-and-mouth disease virus C1-Santa Pau (C-S8). *Gene*, 35:55-61, 1985.
 25. McFARLANE, R.G., MOLITOR, T.W., VAKHARIA, V.N. The detection and differentiation of foot-and-mouth disease viruses using solid-phase nucleic acid hybridization. *J. Virol. Meth.*, 27:175-188, 1990.
 26. McVICAR, J.W., SUTMÖLLER, P. FMD: The agar gel diffusion precipitin test for antibody to virus-infection associated (VIA) antigen as a tool for epizootiologic surveys. *Am. J. Epidemiol.*, 92:273-278, 1970.
 27. MEYER, R.F., BROWN, C.C., HOUSE, C., HOUSE, J.A., MOLITOR, T.W. Rapid and sensitive detection of foot-and-mouth disease virus in tissues by enzymatic RNA amplification of the polymerase gene. *J. Virol. Meth.*, 34:113-226, 1991.
 28. MULLIS, K.B., FALDONA, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*, 155:335-350, 1987.
 29. NEITZERT, E., BECK, E., AUGÉ DE MELLO, P., GOMES, I., BERGMANN, I.E. 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. *Virology*, 184:799-804, 1991.
 30. PINTO, A.A., GARLAND, A.J.M. Immune response to virus-infection-associated (VIA) antigen in cattle repeatedly vaccinated with foot-and-mouth disease virus inactivated by formalin or acetylenimine. *J. Hyg.*, 82:41-50, 1979.
 31. POLATNICK, J. Isolation of a foot-and-mouth disease polyuridylic acid polymerase and its inhibition by antibody. *J. Virol.*, 33:774-779, 1980.
 32. POLATNICK, J., ARLINGHAUS, R.A. Foot-and-mouth disease virus-induced RNA polymerase in baby hamster kidney cells. *Virology*, 31:601-608, 1967.
 33. RODRIGUEZ, A., MARTINEZ-SALAS, E., DOPAZO, J., DAVILA, M., SAIZ, J.C., SOBRINO, F. Primer design for specific diagnosis by PCR of highly variable RNA viruses: typing of foot-and-mouth disease virus. *Virology*, 189:363-367, 1992.
 34. ROSSI, M.S., SADIR, A.M., SCHUDEL, A.A., PALMA, E.L. Detection of foot-and-mouth disease virus with DNA probes in bovine esophageal-pharyngeal fluids. *Arch. Virol.*, 99:67-74, 1988.
 35. STRAVER, P.J., BOOL, P.H., CLAESSENS, A.M.J.M., VAN BEKKUM, J.G. Some properties of carrier strains of foot-and-mouth disease virus. *Arch. Ges. Virusforsch.*, 29:113-126, 1970.
 36. STRAVER, P.J., VAN BEKKUM, J.G. Plaque production by carrier strains of foot-and-mouth disease virus in BHK monolayers incubated at different temperatures. *Arch. Ges. Virusforsch.*, 37:12-18, 1972.
 37. STREBEL, K., BECK, E., STROHMAIER, K., SCHALLER, H. Characterization of foot-and-mouth disease virus gene products with antisera against bacterially synthesized fusion proteins. *J. Virol.*, 57:983-991, 1986.
 38. SUTMÖLLER, P., COTTRAL, G.E. Improved techniques for the detection of FMDV in carrier cattle. *Arch. Ges. Virusforsch.*, 21(2):170-177, 1967.
 39. SUTMÖLLER, P., GAGGERO, A. Foot-and-mouth disease carriers. *Vet. Rec.*, 77:968-969, 1965.
 40. SUTMÖLLER, P., McVICAR, J.W., COTTRAL, G.E. The epizootiological importance of foot-and-mouth disease carriers. I. Experimentally produced foot-and-mouth disease carriers in susceptible and immune cattle. *Arch. Ges. Virusforsch.*, 23:227-235, 1968.
 41. VAN BEKKUM, J.G., FRENKEL, H.S., FREDERIKS, H.H.J., FRENKEL, S. Observation on the carrier state of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus. *Tijdschr. Diergeneesk.*, 84:1159-1164, 1959.

PUBLICACIONES DE PANAFTOSA PANAFTOSA PUBLICATIONS

QUANTITATIVE ASSESSMENT OF THE RISK OF DISEASE TRANSMISSION BY BOVINE EMBRYO TRANSFER

Scientific and Technical Monograph Series No. 17. Por/By P. Suttmoller & A.E. Wrathall. PANAFTOSA, Rio de Janeiro, Brazil, 1995, 40 pp. Precio/Price: US\$ 10.00. ISSN 0101-4897

El Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud) hace muchos años tiene el comrpiso de asistir a los países del hemisferio occidental en el intercambio internacional seguro y legal de bovinos y su material genético. Para prevenir la diseminación de la fiebre aftosa en particular, a través de los años el Centro ha cooperado activamente con los países de la Región en el desarrollo de protocolos y de pruebas para el movimiento internacional de animales y de material genético.

Con base en una investigación extensa y en la experiencia de campo, en la década pasada quedó claro que el movimiento de embriones tiene varias ventajas para el transporte de material genético entre los países. Sin embargo, los progresos en la flexibilidad de las reglamentaciones existentes para permitir el movimiento legal de embriones entre los países con estados diferentes de enfermedad han sido lentos. Una razón para esta aparente resistencia para cambios, por parte de las autoridades veterinarias, ha sido la inhabilidad de proveer estimativas satisfactorias sobre los riesgos de enfermedad.

El Comité de Importación/Exportación de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS) ha clasificado varios agentes patógenos como "agentes de enfermedad para los cuales se han acumulado evidencias suficientes para mostrar que el riesgo de transmisión de enfermedad es insignificante si los embriones son adecuadamente manipulados, desde la recolección hasta la transferencia". Sin embargo, aunque universalmente se ha aceptado que la transferencia de embriones es el método más seguro para el movimiento de material genético de animales, se realizaron algunos esfuerzos para cuantificar los niveles de reducción de riesgo de enfermedad alcanzados por medio de los procedimientos descritos

The Pan American Foot-and-Mouth Disease Center (Pan American Health Organization/World Health Organization) has a long standing commitment to assist countries of the Western Hemisphere in the safe and legal international exchange of livestock and their genetic material. To prevent the spread of foot-and-mouth disease (FMD) in particular, the Center has cooperated actively over the years with countries of the Region in the development of protocols and testing procedures for the international movement of animals and genetic material.

Over the past decade, based on extensive research and field experience, it has become apparent that moving embryos has many advantages for moving genetic material between countries. However, progress has been slow in relaxing the existing regulations to permit legal embryo movements between countries that have a different animal disease status. One reason for this apparent reluctance to change by veterinary authorities has been the inability to provide satisfactory estimates of the disease risks involve.

The Import/Export Committee of the International Embryo Transfer Society (IETS) has classified several pathogens as "disease agents for which sufficient evidence has accrued to show that the risk of disease transmission is negligible, if the embryos are properly handled between collection and transfer". However, while it is universally accepted that embryo transfer is the safest method for moving animal genetic material, few attempts have been made to actually quantify the levels of disease risk reduction achieved by the procedures described in the Manual of the IETS. In this paper we present a Quantitative Risk Assessment (QRA) model for disease transmission by bovine embryo transfer.

In our dealings with the potential users of this study we found it necessary to briefly describe some

en el Manual de la IETS. En este trabajo presentamos un modelo de estimación cuantitativa de riesgo (ECR) de transmisión de enfermedad por transferencia de embrión bovino.

En nuestros entendimientos con usuarios potenciales de este estudio hemos encontrado necesario describir brevemente algunos aspectos generales sobre los procedimientos de transferencia de embriones bovinos y discutir los factores de riesgo involucrados. Sobre esta información técnica proponemos un escenario que cubre las siguientes probabilidades:

- en la Región existe la enfermedad mientras se preparan los embriones para exportación
- la enfermedad está presente en la finca donante
- el Sistema de Vigilancia de Salud Animal falla en detectar una finca infectada
- el Grupo de Recolección de Embriones (GRE) falla en detectar una finca infectada
- las donantes de embriones con infección contaminan los embriones en el aparato genital
- el GRE falla en remover los embriones no exportables (embriones con zona pelúcida (ZP) no intacta, embriones con material extraño adherido a la ZP, blastocitos expandidos (eclodidos))
- los embriones para exportación son lavados inadecuadamente
- los residuos patógenos se adhieren a embriones para exportación adecuadamente lavados
- la enfermedad no es detectada en la finca de origen mientras los embriones están almacenados
- las pruebas de laboratorio fallan en detectar el agente infeccioso en el fluido recolectado de una donante infectada
- el agente infeccioso es transmitido por el embrión infectado a una receptora
- la enfermedad es transmitida por un vector y este se encuentra presente.

Con el fin de ilustrar este trabajo hemos seleccionado en Brasil una región endémica de fiebre aftosa y se usaron los datos en el modelo de ECR para estimar los riesgos de transmisión de fiebre aftosa por la transferencia de embrión bovino. La aplicación de esta metodología no solo resultará en el intercambio de embriones libremente sino que, también, brindará nuevos conocimientos sobre cómo comercializar más libremente y con mayor seguridad otros productos de origen animal.

general aspects of bovine embryo transfer procedures and to discuss the risk factors involved. Based on this technical information we propose a scenario pathway that covers the probabilities that:

- the disease is in the Region while the embryos are being assembled for export
- the disease is on a donor farm
- the Animal Health Surveillance System fails to detect an infected farm
- the Embryo Collection Team (ECT) fails to detect an infected farm
- embryo donors with infection contaminate embryos in the genital tract
- the ECT fails to remove non-exportable embryos (embryos with non-intact zona pellucida (ZP), embryos with extraneous material adhering to the ZP, hatched blastocysts)
- exportable embryos are inadequately washed
- residual pathogen adheres to adequately washed exportable embryos
- the disease is not detected on the farm of origin while the embryos are in storage
- laboratory tests fail to detect the disease agent in the collection fluid from an infected donor
- the disease agent is transmitted by the infectious embryo to a recipient
- the disease is vector transmitted and the disease vector is present.

For the purpose of illustration we selected an FMD endemic region in Brazil and the data were used in the QRA model to estimate risks of transmission of FMD by bovine embryo transfer. We hope that the application of this methodology will not only result in freer exchanges of embryos, but will also provide fresh insight into how to trade more freely and safely in other products of animal origin.

RESOLUCIONES Y RECOMENDACIONES DE LA COMISIÓN SUDAMERICANA PARA LA LUCHA CONTRA LA FIEBRE AFTOSA. 1982-1994.

Serie de Monografías Científicas y Técnicas N° 18. PANAFTOSA, Rio de Janeiro, Brasil, 1995, 150 pp. ISSN 0101-4897

Esta publicación reúne los antecedentes y las resoluciones de las reuniones ordinarias de la Comisión Sudamericana para la Lucha contra la Fiebre Aftosa (COSALFA) y las recomendaciones emanadas de los seminarios internacionales previos a esas reuniones. Su publicación se consideró de gran interés debido a la importancia del contenido de sus resoluciones y recomendaciones y a su utilidad como instrumento de consulta.

This publication compiles the background and resolutions emanated from the regular meetings of the South American Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease (COSALFA) and recommendations of the international seminars which are held previous to these meetings. Its publication is considered of great value due to the importance of resolution and recommendation contents and its usefulness as consulting tool.

Resúmenes

Abstracts

DIMITRIADIS, I.A., DELIMPALTAS, P.

Texto en alemán. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 105 (3): 90-95, 1992. In: *Vet. Bull.*, 63 (2), 1993. Aristotelian University, Thessaloniki Veterinary Faculty, Department of Mikrobiology, Greece.

Epidemiología de la fiebre aftosa en Grecia, en el período de 1962 a 1988.

Grecia ha sido considerada libre de fiebre aftosa desde 1984. En el período de 1962 a 1988, en Grecia hubo 29 brotes primarios y 240 secundarios (un total de 269), 187 de los cuales fueron causados por el tipo O, 60 por el tipo A, 14 por el tipo C, 6 por el tipo SAT-1 y 2 por el tipo Asia-1 del virus. De los 269 brotes, 81 ocurrieron en Attiki, 57 en Evros (cerca de Turquía) y 131 en otras provincias. 197 de los brotes fueron en bovinos, 60 en porcinos y 12 en ovejas y cabras. La mayoría de los 29 brotes primarios surgieron en enero y ninguno en diciembre. Los resultados epidemiológicos indican que la fiebre aftosa es introducida en Grecia, tanto por la importación de carne y productos de carne (especialmente, en Attiki) como a partir del país vecino, Turquía (en especial, en Evros), donde la enfermedad es endémica.

Epidemiology of foot and mouth disease from 1962 to 1988 in Greece.

Greece has been considered to be free from FMD since 1984. During the period from 1962 to 1988 there were 29 primary and 240 secondary (a total of 269) outbreaks in Greece, of which 187 were caused by Type O, 60 of Type A, 14 of Type C, 6 of Type SAT 1 and 2 of Type ASIA 1 of the virus. Of the 269 cases 81 were in Attiki, 57 in Evros (near Turkey) and 131 in other provinces. 197 of the outbreaks were in cattle, 60 in pigs and 12 in sheep and goats. Most of the 29 primary outbreaks appeared in January and none in December. Epidemiological results indicate that FMD is introduced in Greece either by imported meat and meat products (especially in Attiki) or from the neighbouring country, Turkey (especially in Evros), where the disease is endemic.

ESCARMIS, C., TOJA, M., MEDINA, M., DOMINGO, E.

Texto en inglés. *Virus Res.*, 26 (2), 113-125, 1992. Centr. Biol. Mol., Univ. Autón. Madrid, Canto Blanco, 28049 Madrid, España.

Modificaciones de la región 5' no codificante del virus de la fiebre aftosa, después de una persistencia prolongada en cultivos celulares.

La secuencia de nucleótidos de la región 5' no codificante (5' UTR) del genoma del virus de la fiebre aftosa (VFA) R100, rescatado después de

Modifications of the 5' untranslated region of foot-and-mouth disease virus after prolonged persistence in cell culture.

The nucleotide sequence of the 5'-untranslated region (5'UTR) of the genome of foot-and-mouth disease virus (FMDV) R100, rescued after 100

100 pasajes en células BHK-21 persistentemente infectadas, fue comparada con aquella del virus parental C-S8c1. La divergencia de la secuencia de nucleótidos entre los dos virus es del 1% en regiones heteropoliméricas. Las pocas mutaciones localizadas en la región 5' terminal (fragmento S) y en el sitio interno de entrada del ribosoma (IRES) no parecen afectar, de manera significativa, la firme estructura secundaria pronosticada para estos segmentos del ARN. Una comparación de la 5' UTR del ARN del C-S8c1 o del R100 con la de otros serotipos y subtipos del aftovirus indica la presencia de deleciones (o inserciones) en bloque, no correlacionadas con la clasificación serológica del VFA. Curiosamente, el VFA R100, un virus altamente atenuado para ratones y ganado, contiene un tracto de poliribocitidilado (poli [C]) de aproximadamente 420 nucleótidos, 145 residuos más que su parental, el virulento C-S8c1. Este poli (C) largo del ARN del R100 incluye unos pocos residuos de uridina, distribuidos a intervalos bien regulares. Este es el tracto altamente homopolimérico más largo descrito en un genoma viral y, según nos consta, en cualquier biomolécula informacional.

passages of persistently infected BHK-21 cells, has been compared with that of the parental FMDV C-S8c1. The nucleotide sequence divergence between the two viruses in heteropolymeric regions is 1%. The few mutations located at the 5'-most terminal region (S fragment) and at the internal ribosome entry site (IRES) do not appear to affect significantly the tight secondary structure predicted for these RNA segments. Comparison of the 5'UTR of C-S8c1 or R100 RNA with that of other FMDV serotypes and subtypes indicates the presence of block deletions (or insertions) which do not correlate with the serological classification of FMDV. Remarkably, FMDV R100, a virus highly attenuated for mice and cattle, contains a polyribocytidylate (poly C) tract of about 420 nucleotides, 145 residues longer than its parental, virulent FMDV C-S8c1. This long poly C of R100 RNA includes a few uridine residues interspersed at fairly regular intervals. This is the longest highly homopolymeric tract described in a viral genome and, to our knowledge, in any informational biomolecule.

FONDEVILA, D., URIONA, C., DUFFY, S., LEON, E., SCHUDEL, A.A.

Texto en español. *Veterinaria Argentina*, 9 (90): 686-696, 1992. In: *Vet. Bull.*, 63 (7), 1993. Instituto de Virología e Instituto de Patobiología, Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, C.C. 77 (1708) Morón, Buenos Aires, Argentina.

Determinación de la actividad viral y del nivel de inmunidad poblacional en bovinos vacunados contra el virus de la fiebre aftosa, en el partido de Navarro.

Con el fin de obtener información epidemiológica sobre la infección provocada por el virus de la fiebre aftosa (VFA) en Argentina, durante 1991 se llevó a cabo un estudio estadístico con 348 bovinos provenientes de 71 haciendas del partido de Navarro, provincia de Buenos Aires. Mediante el uso de métodos serológicos se determinó el estado de inmunidad y la prevalencia de infección (anticuerpos contra antígenos virales). Se descubrieron parámetros de correlación entre títulos neutralizantes y protección a través del método logit. El índice de inmunidad poblacional para los

Determination of viral activity and population immunity level in cattle vaccinated against foot-and-mouth disease virus in the Navarro region.

To obtain epidemiological information about foot-and-mouth-disease virus (FMDV) infection in Argentina, a statistical study was carried out on 348 cattle from 71 farms of the Navarro region, Buenos Aires Province, during 1991. Immune status and infection prevalence (antibodies against viral antigens) were determined using serological methods. Correlation parameters between neutralizing titres and protection was found using the logit method. The population immunity rate for FMDV subtypes A Argentina 87, A Argentina 79 and C Argentina 85 was 50%, and for O₁ Caseros 77%

subtipos A Argentina 87, A Argentina 79 y C Argentina 85 fue de 50%, y para O₁ Caseros, de 77% (niveles medio altos). Estos valores pueden ser considerados bastante aceptables, visto que las muestras fueron recolectadas al final del período de protección vacunal (6 meses después de la vacunación, en bovinos menores de 2 años, y 12 meses después de la vacunación, en mayores de 2 años). Niveles inferiores de inmunidad fueron constatados en bovinos menores de 1 año. Fue detectada actividad viral en el 93% de las haciendas. La prevalencia de infección fue del 16% en bovinos menores de 1 año y del 37,6% en mayores de 1 año. Los índices más elevados de infección fueron encontrados en rebaños de cría.

(high-medium levels). These values can be considered quite acceptable since samples were collected at the end of the vaccinal protection period (6 months after vaccination in those younger than 2 years and 12 months after vaccination in those older than 2 years). Lower levels of immunity were seen in cattle younger than 1 year. Viral activity was detected in 93% of the farms. Infection prevalence was 16% in cattle < 1 year old and 37.6% in those > 1 year old. Highest rates of infection were found in breeding herds.

GONZALEZ, M., MATEU, M.G., MARTINEZ, M.A., CARRILLO, C., SOBRINO, F.

Texto en inglés. *Vaccine*, 10 (11) 731-734, 1992. Dep. Sanidad Anim., CIT-INIA, C/, Embajadores 68, 28012 Madrid, España.

Comparación de la proteína VP1 de la cápside de los virus usados para la producción y desafío de vacunas antiaftosa en España.

Se ha encontrado una frecuencia significativa de sustitución de aminoácidos, que afectan sitios antigénicos importantes en la proteína VP1 de la cápside entre las preparaciones virósicas utilizadas para la producción y para el desafío, en ensayos de protección, de las vacunas antiaftosa. Las sustituciones de aminoácidos presentes en uno de los virus estudiados abolieron su reactividad con dos anticuerpos monoclonales neutralizantes que reconocieron epítopes diferentes en VP1. Por lo tanto, los resultados obtenidos ilustran el alto potencial para la variación antigénica introducida por los múltiples ciclos de crecimiento a que normalmente se someten las cepas utilizadas 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 substitution, 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.

HANCOCK, R.D., PRADO, J.A.P.

Texto en inglés. *Veterinary Record*, 132 (11): 278-279, 1993. Instituto de Pesquisas Veterinárias "Desidério Finamor", Caixa Postal 2076, 90001 Porto Alegre, RS, Brasil.

La fiebre aftosa en un rebaño de ovejas en el sur del Brasil.

En 1990, un brote de fiebre aftosa (FA) afectó 4 haciendas en Rio Grande do Sul, Brasil, causando

Foot-and-mouth disease in a flock of sheep in southern Brazil.

In 1990 an outbreak of foot-and-mouth disease (FMD) affected 4 farms in Rio Grande do Sul,

pérdidas significativas en ovejas. Se llevó a cabo un estudio detallado en una de las haciendas donde se recogió material orofaríngeo y muestras sanguíneas en 5 visitas: día 0 (aproximadamente 4 semanas después del brote inicial) y los días 59, 102, 152 y 194. Clínicamente, la enfermedad fue caracterizada por grave cojera, pérdida de condición física y aborto en ovejas; no se notaron lesiones orales. Alrededor del día 59, aproximadamente 40% de las ovejas del rebaño o habían fallecido o estaban tan debilitadas que fueron muertas por perros. En las visitas siguientes, no se observaron señales de la enfermedad. El diagnóstico de FA fue confirmado por cultivo del virus tipo O subtipo 1 de una lesión vesicular de lengua bovina, en la hacienda. La presencia de anticuerpos a un antígeno asociado a una infección del virus de FA al comienzo del estudio, así como la presencia de altos títulos de anticuerpos virusneutralizantes, que fueron disminuyendo durante el período de la investigación, indicaron que la infección había sido reciente. Cultivos de virus produjeron el virus de la FA tipo O y demostraron que algunas de las ovejas continuaron como portadoras del virus durante el período del estudio. Se recomienda que el riesgo representado por ovejas portadoras para el ganado no vacunado del área debería ser evaluado antes de declararse esta área "libre de FA", como parte del esquema de erradicación de FA en la región del Río de la Plata.

HINGLEY, P.J.

Texto en inglés. *Biometrics*, 47 (3): 1019-1047, 1991. Tokyo Securities Co. (Europe) Limited, 1 London Wall Buildings, London Wall, London EC2M 5PP, UK.

Un modelo de curso de tiempo basado en la selección clonal, para las respuestas de los anticuerpos a la vacuna inactivada, con aplicaciones en la fiebre aftosa.

Se revisan los modelos publicados para el curso de tiempo de la respuesta inmunitaria, con respecto a su aplicabilidad a los datos obtenidos de animales inoculados con vacuna inactivada. Se necesitan modelos sencillos para que sean claros y directos los procedimientos de ajuste estadístico. Se ha determinado la utilidad de una clase de

Brazil causing significant sheep losses. A detailed study was carried out on one of the farms where oropharyngeal scrapings and blood samples were taken on 5 visits: day 0 (approximately 4 weeks after the initial outbreak) and days 59, 102, 152 and 194. Clinically, the disease was characterized by severe lameness, loss of body condition and abortion in ewes; no oral lesions were seen. By day 59 approximately 40% of the sheep flock had either died or become so debilitated that they had been killed by dogs. No signs of disease were seen on subsequent visits. The diagnosis of FMD had been confirmed following culture of virus type O subtype 1 from a vesicular lesion on a bovine tongue on the farm. The presence of antibodies to FMD virus infection associated antigen at the start of the investigation and the presence of high virus neutralizing antibody titres which declined over the investigation period indicated that the infection was recent. Virus cultures yielded FMD virus type O and demonstrated that some of the sheep continued to carry virus throughout the investigation. It is suggested that the risk posed by carrier sheep to unvaccinated stock in the area should be assessed before the area is declared "FMD free" as part of the River Plate FMD eradication scheme.

A clonal selection based timecourse model for antibody responses to killed vaccine, with applications to foot and mouth disease.

Published models for the timecourse of the immune response are reviewed for their applicability to data from animals that have been injected with killed vaccine. Simple models are required so that statistical fitting procedures become straightforward. A class of models that incorporates the concept of clonal selection has been found useful.

modelos que incorpora el concepto de la selección clonal. La memoria inmunitaria se describe en términos de la persistencia de la afinidad mediana de anticuerpos cuando la concentración global de anticuerpos haya declinado hacia la línea base. El modelo se demuestra por medio de las distribuciones de afinidad por puntos múltiples y densidades exponenciales negativas iniciales, a partir de las cuales se puedan desarrollar las condiciones para su demarcación. Se hacen predicciones que son consistentes con las experiencias sobre la evolución de datos del inmunoensayo, utilizando la vacuna antiaftosa.

Immune memory is described in terms of persistence of mean antibody affinity when the overall concentration of antibody has declined towards background. The model is demonstrated on multipoint affinity distributions and initial negative exponential densities, from which conditions for boundedness can be developed. Predictions are made that are consistent with experiments on the evolution of immunoassay data using foot and mouth disease vaccine.

KITCHING, R.P.

Texto en inglés. *British Veterinary Journal*, 148 (5): 375-388, 1992. In: *Vet. Bull.*, 63 (1), 1993. World Reference Laboratory for Foot-and Mouth Disease, Pirbright Laboratory, Institute for Animal Health, Ash Road, Pirbright, Surrey, UK.

La aplicación de la biotecnología en el control del virus de la fiebre aftosa.

Este trabajo indica que la biotecnología todavía no ha realizado la promesa inicial con respecto al control de la fiebre aftosa. Sin embargo, ya está complementando a la epidemiología al proporcionarle herramientas específicas y muy sensibles para la identificación y caracterización de las cepas del virus de la fiebre aftosa. Hoy en día se dispone de mucho más conocimiento sobre la evolución del virus en varias situaciones de campo, como consecuencia del desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa y las técnicas para la secuencia de nucleótidos. Aunque los genes individuales del virus pueden ser clonados para producir una cantidad de vectores, la biotecnología todavía no ha producido ninguna vacuna segura y eficaz para substituir la vacuna convencional derivada de cultivos de tejidos. La investigación prosigue pero, hasta que haya un descubrimiento mayor, se concluye que el control y erradicación de la fiebre aftosa dependen de las técnicas epidemiológicas clásicas, usando los nuevos métodos biotecnológicos.

The application of biotechnology to the control of foot-and-mouth disease virus.

This review indicates that biotechnology has not fulfilled its initial promise in relation to the control of foot-and-mouth-disease. However, it is now complementing epidemiology by providing very sensitive and specific tools for identifying and characterizing strains of FMD virus. Much more is now known about the evolution of the virus in various field situations, as a result of the development of polymerase chain reaction and nucleotide sequence techniques. Although the individual genes of the virus can be cloned into a number of vectors, a safe and effective vaccine has not yet been produced by biotechnology to replace the conventional tissue culture derived vaccine. Research is continuing, but until a major breakthrough is made, it is concluded that control and eradication of FMD still relies on classical epidemiological techniques, making use of new biotechnological methods.

LIN, Y.L., LIU, S.T., YANG, Y.H., CHIU, S.Y., PAN, I.C.

Texto en inglés. *Taiwan Journal of Veterinary Medicine and Animal Husbandry*, 60: 35-42, 1992.
In: *Vet. Bull.*, 63 (1), 1993. Taiwan Res. Inst. Animal Health, Tansui, Taiwan.

Detección del gen del ARN polimerasa del aftovirus, a partir de células infectadas por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Fueron utilizados tres juegos de oligonucleótidos iniciadores para amplificar el genoma del aftovirus, en la reacción en cadena de la polimerasa. Los primeros dos juegos, con iniciadores FMD-485, FMD-49 y FMD-78, amplificaron 8 de las 11 cepas del aftovirus probadas, AS, ASW, A24, C1, C3, SAT1, SAT2 y SAT3, pero no O1-Lomb, O1-Campos o Asia-1. El tercer juego de iniciadores basados en la secuencia de nucleótidos para la polimerasa del ARN, de C1-Santa Pau (C-58) detectó con éxito el O1-Lomb y Asia-1, pero no el O1-Campos. Se llegó a la conclusión que entre los más importantes serotipos y subtipos existe una heterogeneidad en la secuencia de nucleótido de la parte no funcional del gen del ARN polimerasa y que las diferencias son detectables por la técnica de PCR.

Detection of RNA polymerase gene of foot-and-mouth disease virus (FMDV) from infected cell by polymerase chain reaction (PCR).

Three sets of oligonucleotide primers were used to amplify the aphthovirus genome in the polymerase chain reaction. The first 2 sets, with primers FMD-485, FMD-49, and FMD-78, amplified 8 of the 11 aphthovirus strains tested, AS, ASW, A24, C1, C3, SAT1, SAT2 and SAT3, but not O1-Lomb, O1-Campos, or Asia-1. The third set of primers based in the nucleotide sequence for the RNA polymerase of C1-Santa Pau (C-58) successfully detected O1-Lomb and Asia-1 but not O1-Campos. It was concluded that among the major serotypes and subtypes there is a heterogeneity in the nucleotide sequence for the non-functional portion of the RNA polymerase gene and that the differences are detectable by the PCR technique.

McCULLOUGH, K.C., SIMONE DE, F., BROCCCHI, E., CAPUCCI, L., CROWTHER, J.R., KIHM, U.
Texto en inglés. *J. Virol.*, 66 (4): 1835-1840, 1992. Inst. Viruskr. und Immunprophylaxe, Hagenaustr. 74, CH-4025 Basel, Switzerland.

La respuesta inmunitaria protectora contra la fiebre aftosa.

Los agentes causantes de la fiebre aftosa son pequeños virus icosaedrales del grupo aftovirus de la familia Picornaviridae. No existe evidencia de que estos virus infecten las células del sistema inmunitario o, de otra forma, interfieran en detrimento de su función; además, no ha sido posible relacionar las reacciones de citotoxicidad contra las células infectadas por el aftovirus con la eficacia de la respuesta inmunitaria a la infección por este virus. Por otra parte, existe una asociación estrecha entre el anticuerpo contra el aftovirus y la respuesta inmunitaria protectora. La inducción de este anticuerpo depende de la estructura de los sitios antigénicos virales y de la presencia concomitante

Protective immune response against foot-and-mouth disease.

The causative agents of foot-and-mouth disease (FMD) are small icosahedral viruses of the Aphthovirus group within the Picornaviridae family. There is no evidence that these viruses infect cells of the immune system or otherwise interfere detrimentally with their function; additionally, it has not been possible to relate cytotoxicity reactions against virus-infected cells to the efficacy of the immune response against FMD virus infection. In contrast, there is a close association between FMD virus antibody and the protective immune response. Induction of this antibody is dependent on the structure of the viral antigenic sites and on the concomitant presence of Th-lymphocyte

de los epítopes de linfocitos Th, aunque se haya informado de una respuesta independiente del linfocito Th. La respuesta inmunitaria inducida por el aftovirus era dependiente del linfocito Th solamente cuando se usaban dosis bajas de antígeno.

epitopes, although a Th-lymphocyte-independent response has been reported. The immune response induced by FMD virus was only Th-lymphocyte dependent when low doses of antigen were used.

MASSIRIO, I., PATTACINI, O., BERGOMI, S., LODETTI, E., PANINA, G.F.

Texto en italiano. *ATTI della Federazione Mediterranea Sanita e Produzione Ruminanti*, 1, 257-262, 1991. Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia, Brescia, Italy.

La inmunidad calostrál en corderos paridos por ovejas multivacunadas con vacuna antiaftosa trivalente tipo O/A/C: la cinética de anticuerpos.

Dos meses antes del parto, se inocularon 18 ovejas preñadas provenientes de un rebaño vacunado regularmente contra la fiebre aftosa con 2 ml de la vacuna antiaftosa trivalente. Se recogieron muestras de sueros de los 18 corderos a los 10, 20, 40, 60, 90 y 120 días de edad. Tres de los corderos recibieron la vacuna trivalente a los 90 días de edad. No hubo diferencia en los títulos de anticuerpos o en el decaimiento de la inmunidad a los tres antígenos. La vacunación produjo un aumento significativo de inmunidad y se concluye que no había evidencia de que los anticuerpos maternos hubieran interferido en la vacunación.

Colostrál immunity in lambs born to multi-vaccinated sheep vaccinated with trivalent O/A/C anti-foot-and-mouth disease vaccine: antibody kinetics.

18 pregnant ewes from a flock regularly vaccinated against foot-and-mouth disease (FMD) were given 2 ml of trivalent FMD vaccine 2 months before parturition. Serum samples were taken from the 18 lambs at 10, 20, 40, 60, 90 and 120 days of age. Three of the lambs were given the trivalent vaccine at 90 days of age. There was no difference in antibody titres or in the decay in immunity to the 3 antigens. Vaccination produced a significant increase in immunity and it is concluded that there was no evidence of maternal antibodies interfering with vaccination.

MERSIE A., TAFESSE, B., GETAHUN, F., TEKLU, W.

Texto en inglés. *Tropical Animal Health and Production*, 24 (3): 144, 1992. In: *Vet. Bull.*, 63 (3), 1993. Dire Dawa Regional Veterinary Laboratory, Ethiopia.

Las pérdidas causadas por la fiebre aftosa en un área de agricultura mixta en el este de Etiopía.

Una epidemia en la región de Hararge, en el este de la Etiopía, tradicionalmente un área de agricultura mixta, brindó una oportunidad para substanciar o refutar la creencia popular de que la fiebre aftosa no afecta adversamente al ganado indígena. Se examinaron clínicamente los bovinos enfermos en rebaños afectados y se recogieron muestras en 17 Asociaciones de Campesinos, para

Losses from foot-and-mouth disease in a mixed farming area of eastern Ethiopia.

An epidemic in the Hararge Region of Eastern Ethiopia, a traditional mixed farming area, presented an opportunity to substantiate or refute the common belief that FMD has no adverse effect on indigenous cattle. Sick cattle in affected herds were examined clinically and specimens for laboratory confirmation were collected in 17 Peasant Associations. In addition, questionnaires were com-

confirmación en laboratorio. Además, 259 agricultores que conocían la enfermedad completaron los cuestionarios; el 96% de ellos la llamaba de "masa." Se consideró como origen de la infección a tres fuentes de agua regularmente visitadas por los rebaños de ganado de las tierras bajas. El libre movimiento de los animales contribuyó a la diseminación de la enfermedad a través de grandes áreas de la región. Todos los animales enfermos examinados presentaban señales clínicas típicas de la fiebre aftosa; la mayoría (86%) tenía lesiones orales y podales, mientras que los demás tenían solamente lesiones orales. La enfermedad también se observó en ovejas y cabras que tenían contacto con los enfermos. Todas las muestras enviadas al Centro Mundial de Referencia de Fiebre Aftosa, en Pirbright, Inglaterra, contenían el virus aftoso tipo O. De los 898 bovinos examinados, 543 (60,5%) desarrollaron la enfermedad. De un total estimado de 150 terneros murieron nueve (6%). También se infectaron cinco de 21 ovejas (71%) y 40 de 64 cabras (62,5%). Aproximadamente un tercio de los propietarios trataba los animales enfermos aplicando en sus lesiones miel y una mezcla de sal y pimienta. Cuando se les preguntó si consideraban perjudicial la enfermedad, el 64% respondió afirmativamente; de este total, el 83% mencionó específicamente la pérdida de leche y la interrupción en el cultivo de la tierra debido a la falta de animales para tirar el arado, lo que perduraba por un mínimo de 20 días.

pleted by 259 farmers, all of whom were familiar with the disease and 96% called it Massa. Three watering points visited lowland cattle herds were regarded as the source of infection. The free movement of animals contributed to the spread of the disease over large areas of the Region. All sick animals examined had clinical signs typical of FMD; most (86%) had oral and foot lesions, the rest having oral lesions only. The disease was also observed in in-contact sheep and goats. All specimens sent to the World FMD Reference Centre at Pirbright contained type O FMD virus. Of 898 cattle examined 543 (60.5%) developed the disease. Nine out of an estimated total of 150 calves (6%) died. Five of 21 sheep (71%) and 40 out of 64 goats (62.5%) were also affected. Nearly one third of the owners treated the sick by dressing the lesions with honey and a mixture of common salt and pepper. When the owners were asked whether they consider the disease harmful 64% said yes and among them 83% specifically mentioned loss of milk and interruption of ploughing for at least 20 days.

MEYER, R.F., BROWN, C.C., HOUSE, C., HOUSE, J.A., MOLITOR, T.W.

Texto en inglés. *J. Virol. Methods.*, 34 (2): 161-172, 1991. USDA-APHIS-S & T-NVSL-FADDOL, P.O. Box 848, Greenport, NY 11944, USA.

Detección rápida y sensible del virus de la fiebre aftosa en tejidos por la amplificación enzimática del ARN del gen de la polimerasa.

Se investigó la detección directa del virus de la fiebre aftosa (VFA) en tejidos de bovinos y porcinos infectados, usando una técnica modificada de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se encontró un alto grado de conservación entre los siete serotipos virales, en la región genómica del

Rapid and sensitive detection of foot-and-mouth disease virus in tissues by enzymatic RNA amplification of the polymerase gene.

Direct detection of foot-and-mouth disease (FMD) virus from infected bovine and porcine tissue was investigated using a modified polymerase chain reaction (PCR) technique. A high degree of conservation was found in the genomic region coding for the viral RNA polymerase among

ARN vírico que codifica para la polimerasa. Se construyeron un par oligomérico y una sonda a partir de los datos de la secuencia consenso dentro de esta área. La técnica fue específica, según se determinó por el examen de por lo menos otros 12 virus, incluyendo enterovirus y otros agentes de las enfermedades vesiculares. La amplificación enzimática in vitro del ADNc del ARN vírico utilizando la técnica modificada de PCR, es altamente específica, rápida y por lo menos, tan sensible como los procedimientos usados hoy en día para el diagnóstico del VFA en laboratorio.

the seven FMD viral (FMDV) serotypes. An oligomeric pair and probe were constructed from consensus sequence data within this area. The technique was specific, as determined by examination of at least 12 other viruses, including enteroviruses and other agents of vesicular disease. In vitro enzymatic amplification of cDNA from FMDV RNA using the modified PCR technique is highly specific, rapid and at least as sensitive as presently used procedures for FMDV laboratory diagnosis.

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

Texto en inglés. *Indian J. Virol.*, 7 (1): 33-45, 1991. In: *Vet. Bull.*, 63 (4), 1993. Indian Veterinary Research Institute, Bangalore Campus, Hebbal, Bangalore 560 024, India.

Estudios de crecimiento del virus tipo Asia-1 de la fiebre aftosa, en diferentes sistemas celulares.

Se investigó el crecimiento del virus tipo Asia-1 de la fiebre aftosa en células primarias de riñón de ternero y células BHK-21. El efecto citopatogénico (CPE) fue grande después de 4 horas de infección en células de suspensión Razi, células de suspensión BHK-21 Bangalore y en células primarias de riñón de ternero. El título más alto de infectividad fue registrado a las 16 horas de infección. Todos los sistemas de células indicaron 40 UFC/ml a las 4 horas, creciendo gradualmente hasta llegar al ápice entre las 12 y 24 horas después de su infección. Fueron examinadas las características de placas del virus Asia-1 en diferentes sistemas celulares. Se acusó presencia de placas predominantemente grandes, y algunas de tamaño medio, en células de riñón de ternero. En monocamadas de células BHK-1 Glasgow, la mayoría de las placas fueron de tamaño medio, mientras que en células de suspensión BHK fueron principalmente placas pequeñas. Los virus cultivados en células primarias de riñón de ternero alcanzaron un máximo de antígeno 146S a las 24 horas de infección. En un sistema de células BHK-21, tanto en monocamada como en suspensión, se registró un máximo de antígeno 146S a las 16 horas de infección. En cambio, en células de suspensión Lindholm, el máximo de contenido de 146S fue registrado a las 24 horas de infección.

Growth studies of foot and mouth disease virus type Asia-1 in different cell systems.

The growth of foot and mouth disease virus type Asia-1 was investigated in primary calf kidney cells and BHK-21 cells. The cytopathogenic effect (CPE) was large after 4 h of infection in Razi suspension cells, BHK-21 Bangalore suspension cells and in primary calf kidney cells. The highest infectivity titre was recorded at 16 h after infection. All the cell systems gave 40 CFU/ml at 4 h and it gradually increased and reached a maximum between 12 to 24 h of infection. The plaque characteristics of Asia-1 virus were studied in different cell systems. Mostly large plaques and a few medium size plaques were present in calf kidney cells. In BHK-21 Glasgow monolayer cells most plaques were of medium size whereas in BHK suspension cells mostly small plaques were observed. Virus grown in primary calf kidney cells yielded maximum 146S antigen at 24 h of infection. In BHK-21 cell system both in monolayer and in suspension, maximum 146S antigen was recorded at 16 h after infection. Whereas in Lindholm suspension cells the maximum 146S content was recorded at 24 h after infection.

PALANISAMY, R., RAMANNA, B.C., ANANDA RAO, K., SRINIVASAN, V.A.

Texto en inglés. *Microbiologia*, 15 (1): 45-50, 1992. In: *Virology & AIDS Abstracts*, 26 (1), 1993. Indian Immunol., 11-4-657, Lakdi-ka-Pul, 500 004 Hyderabad, India.

La vacunación combinada de ganado contra la fiebre aftosa y la rabia.

Tres grupos de terneros cruzados fueron vacunados, uno con la vacuna antiaftosa, uno con una combinación de vacuna antiaftosa y antirrábica y uno con vacuna antirrábica. Se determinó la eficacia de las vacunas mediante ensayos de anticuerpos obtenidos en sueros a diferentes intervalos posvacunación. Los resultados del estudio indicaron que la respuesta inmunitaria de animales, sea a una sola inoculación de vacuna antiaftosa, o a la combinación de vacunas antiaftosa y antirrábica, fue insatisfactoria debido a los anticuerpos maternos derivados contra el antígeno del virus de la fiebre aftosa. La aplicación de solamente el antígeno rábico, o del antígeno rábico mezclado con el del virus de la fiebre aftosa, indujeron títulos satisfactorios de anticuerpos frente al antígeno rábico. No hubo respuestas serológicas significativamente diferentes en animales que recibieron solo la vacuna antiaftosa, solo la vacuna antirrábica o la vacuna combinada antiaftosa-antirrábica.

Una prueba de potencia de la vacuna antiaftosa,

Combined vaccination of cattle against FMD and rabies.

Three groups of crossbred calves were vaccinated with FMD vaccine only, combined FMD + rabies vaccine and rabies vaccine alone. Efficacy of the vaccines was determined by serum antibody assay at different intervals postvaccination. The results of the study indicated that the immune response of animals to a single inoculation of FMD vaccine only as well as combined FMD + rabies vaccine was unsatisfactory due to maternally derived antibodies to FMD virus antigen. Rabies antigen alone as well as combined FMD + rabies antigen induced satisfactory serum antibody titres to rabies antigen. There was no significantly different serological responses in animals administered FMD vaccine only, rabies vaccine only or combined FMD + rabies vaccine.

PAY, T.W.F., HINGLEY P.J.

Texto en inglés. *Vaccine*, 10 (10): 707-713, 1992. 6 Claremont Dr., Woking, Surrey GU22 7SQ, UK.

basada en la respuesta de anticuerpos seroneutralizantes producidos en ganado.

Se describe un método para convertir un título medio de anticuerpos seroneutralizantes, después de la vacunación primaria, directamente en un valor de porcentaje de protección, aplicando una sola curva de regresión. Esto representa ventajas sobre el método indirecto en que se estima primeramente un valor de potencia, en la escala de dosificación log de antígenos, antes de la conversión en un valor de porcentaje de protección, ya que esto exige el uso de tres curvas de regresión individuales.

A potency test method for foot and mouth disease vaccine based on the serum neutralizing antibody response produced in cattle.

A method is described for converting a mean serum neutralizing antibody titre after primary vaccination directly into a percentage protection value using a single regression slope. This has advantages over the indirect method in which a potency value is first estimated on the log antigen dose scale before conversion to a percentage protection value, since to do this requires the use of three separate regression slopes. Test designs for

Se formularon diseños de pruebas para el método serológico, los cuales corresponden a las Recomendaciones del año de 1975 de la Oficina Internacional de Epizootias y que poseen estándares mínimos de potencia, al menos tan altos como los del método de extinción de la dosis del punto final de vacuna, de la Farmacopea europea .

the serological method have been formulated that meet the 1975 Recommendations of the Office International des Epizooties, and which possess minimum potency standards at least as high as those of the European Pharmacopoeia's vaccine dose extinction endpoint method.

PERIOLO, O.H., SEKI, C., GRIGERA, P.R., ROBILOLO, B., FERNANDEZ, G., MARADEI, E., D'ALOIA, R., TORRE, J.L. LA.

Texto en inglés. *Vaccine*, 11 (7): 754-760, 1993. Centro de Virología Animal (Cevan-Conicet), Serrano 661, (1414) Buenos Aires, Argentina.

Uso en gran escala de la prueba ELISA de tipo "sandwich" de bloqueo en fase líquida para la evaluación de la inmunidad protectora frente al aftovirus en bovinos vacunados con vacunas con adyuvante oleoso en la Argentina.

Se evaluaron los niveles de actividad de sueros específicos contra 4 cepas del virus de la fiebre aftosa (VFA) de referencia, en 1634 animales inmunizados con vacunas comerciales cuadrivalentes con adyuvante oleoso, y en 746 animales normales no vacunados, usando la prueba ELISA tipo "sandwich" de bloqueo de la fase líquida (lpELISA). Vacas del área libre de fiebre aftosa de la Argentina fueron examinadas para determinar la ausencia de anticuerpos específicos al VFA (sp VFA Acs) y aquellas que presentaron títulos de lpELISA <1,0 fueron agrupadas en lotes de 16 animales. Ellas fueron vacunadas y desafiadas a los 90 días posvacunación (DPV), con la descarga de 1 a 4 cepas utilizadas para la producción y control de vacunas (cepas prototipos). Muestras de sueros de vacas vacunadas, y de las de control se recogieron a los 60 y 90 DPV, y el nivel de sp VFA Acs fue determinado por la prueba lpELISA. Los animales fueron examinados para detectar señales clínicas de la enfermedad. Los niveles de títulos de los sueros lpELISA fueron directamente correlacionados con el porcentaje de animales protegidos, y el 100, 98, 93, y 87% de los bovinos vacunados con

Large-scale use of liquid-phase blocking sandwich ELISA for the evaluation of protective immunity against aphthovirus in cattle vaccinated with oil-adjuvanted vaccines in Argentina.

Specific serum activity levels against 4 reference strains of foot-and-mouth disease virus (FMDV) were evaluated from 1634 animals vaccinated with commercial quadrivalent oil vaccines and from 746 unvaccinated, naive animals, using the liquid-phase blocking sandwich ELISA (lpELISA) test. Cows from the FMDV-free area of Argentina were tested for the absence of specific FMDV antibodies (sp FMDV Abs) and those showing lpELISA titres < 1.0 were grouped in lots of 16 animals. They were vaccinated and challenged at 90 days postvaccination (DPV) with 1 of 4 virus strains used for vaccine production and control (prototype strains). Serum samples from vaccinated and control cattle were collected 60 and 90 DPV and the level of sp FMDV Abs was determined by lpELISA. Animals were examined for clinical signs of disease. Serum lpELISA titre levels were directly correlated with the percentage of protected animals, and 100, 98, 93 and 87% of the vaccinated cattle with antibody titre levels $\geq 2,1$ were protected against challenge with serotypes C85, A87, O1 Cas and A79, respectively. Evidence is also presented of seroconversion in a sample of

niveles de títulos $\geq 2,1$ fueron protegidos contra un desafío con los serotipos C85, A87, O1 Cas y A79, respectivamente. También se presenta evidencia de seroconversión en una muestra de terneros de 3 a 5 meses de edad vacunados en el campo, que indicaban títulos de IpELISA compatibles con una protección de hasta 150 DPV contra los 4 virus de la vacuna. Los resultados apoyan fuertemente el uso de la prueba IpELISA para una evaluación rápida y confiable de la eficacia de vacunas antiaftosa comerciales, así como para la evaluación de la situación inmunológica del ganado en las regiones endémicas o libres de la fiebre aftosa, en América del Sur.

3-5-month-old calves vaccinated in the field showing IpELISA titres compatible with protection against the 4 vaccine viruses as long as 150 DPV. The results strongly support the use of the IpELISA test for a rapid and reliable evaluation of the efficacy of FMDV commercial vaccines as well as for the assessment of the immunological status of cattle in FMDV-free and endemic regions of South America.

SAIZ J.C., RODRIGUEZ, A., GONZALEZ, M., ALONSO, F., SOBRINO, F.

Texto en inglés. *J. Gen. Virol.*, 73 (10): 2601-2607, 1992. I.N.I.A., Sanidad Animal, Embajadores 68, 28012, Madrid, España.

Respuesta linfoproliferativa heterotípica en porcinos vacunados contra el virus de la fiebre aftosa. Envolvimiento de proteínas de cápsides aisladas.

Se caracterizó la respuesta viral linfoproliferativa *in vitro*, en porcinos vacunados contra el virus de la fiebre aftosa (VFA). Células sanguíneas mononucleares periféricas de animales vacunados, hasta un año posinmunización (p.i.) revelaron una respuesta dependiente del tiempo específica al VFA, en ensayos por blastogénesis celular específica al virus. La concentración viral óptima disminuyó con el tiempo (alrededor de 20 semanas p.i.) y la respuesta fue más rápida y más débil. La linfoproliferación parece ser causada principalmente por células CD4+T. La respuesta fue heterotípica, siendo inducida por todos los serotipos probados (C, A y O), después de solo dos vacunaciones con VFA del serotipo C (C-S8). Cada proteína estructural individual evaluada (VP1, VP2 y VP3) indujo proliferación siendo VP1 y VP3 estimuladores más eficaces. La actividad de seroneutralización *in vitro* y una producción de IgG específica del VFA estaban activas aun a 1 año p.i.

Heterotypic lymphoproliferative response in pigs vaccinated with foot-and-mouth disease virus. Involvement of isolated capsid proteins.

The *in vitro* viral lymphoproliferative response of pigs vaccinated against foot-and-mouth disease virus (FMDV) was characterized. Peripheral blood mononuclear cells from immunized animals up to 1 year after immunization (p.i.) showed a time-dependent FMDV-specific response, as assayed by virus specific cellular blastogenesis. The optimum viral concn decreased with time (around 20 weeks p.i.) and the response was faster and weaker. Lymphoproliferation appeared to be mainly due to CD4+ T cells. The response was heterotypic, being induced by all FMDV serotypes tested (C, A and O) after only 2 vaccinations with FMDV of serotype C (C-S8). Each individual structural protein assessed (VP1, VP2 and VP3) induced proliferation, with VP3 and VP1 being more effective stimulators. *In vitro* serum neutralization activity and FMDV-specific IgG production were active even at 1 year p.i.

SANSON, R.L., STRUTHERS, G., KING, P., WESTON, J.F., MORRIS, R.S.

Texto en inglés. *New Zealand Vet. J.*, 41 (1): 21-28, 1993. In: *Vet. Bull.*, 63 (10), 1993. Department of Veterinary Clinical Sciences, Massey University, Palmerston North, New Zealand.

Extensión potencial de la diseminación de la fiebre aftosa: una encuesta del movimiento de animales y materiales en Southland, Nueva Zelanda.

Se llevó a cabo una encuesta de fincas en el área de Southland, con el propósito de evaluar el potencial para la diseminación de la fiebre aftosa, mediante los patrones normales de movimiento de animales agrícolas y materiales durante un período semejante al que sería esperable desde la llegada del virus a un establecimiento, hasta el día del diagnóstico. Todos los agricultores que participaban de la encuesta tenían que completar un diario, en el que registraban todos los movimientos de personas, animales y materiales que ingresaban o egresaban de sus fincas durante un período de 14 días. La cantidad mediana de movimientos registrados por cada finca era de 50. La distribución de las distancias de los movimientos indicó que la mayoría ocurrió dentro de la vecindad adyacente al punto de origen, ocurriendo el 31,5% y 59,5% de todos los movimientos dentro de un radio de 5 km y 10 km, respectivamente. Para contener el 95% de todos los movimientos, un área en la que se controlara el movimiento tendría que tener un radio de 100 km. Los datos se utilizaron para construir un modelo espacial de simulación para el estudio de los movimientos de egreso de una finca de índice hipotético. Cuando se le incorporaron al modelo los movimientos secundarios de egreso de los destinos primarios, el número promedio de movimientos a ser trazado para contener la enfermedad era de 100 (variación 77 - 160) para un período de simulación de 14 días. El área necesaria para contener el 95% de todos los movimientos tendía a aumentarse ligeramente, dependiendo de la duración de la corrida de simulación. El promedio de movimientos de alto riesgo que ocurrieron dentro del radio de 100 km fue de 3,4.

The potential extent of transmission of foot-and-mouth disease: a study of the movement of animals and materials in Southland, New Zealand.

A survey of Southland farms was conducted to assess the potential for foot-and-mouth disease dissemination through normal movement patterns of farm animals and materials over a period similar to what would be expected from the time the virus arrived on a property to the time of diagnosis. Each farmer participating in the survey was required to complete a diary, recording all movements of people, animals and material on to or off a farm during a 14-day period. The mean number of movements recorded per farm was 50. The distribution of movement distances showed the majority of movements occurred within the immediate neighbourhood of the origin, with 31.5% and 59.5% of all movements occurring within 5 km and 10 km respectively. In order to contain 95% of all movements, an area where movement was controlled would have to have a radius of 100 km. The data was then used to construct a spatial simulation model to study the movements off a hypothetical index farm. When secondary movements off primary destinations were included in the model, the mean number of movements to be traced to contain the disease was 100 (range 77-160) for a 14-day simulation period. The area required to contain 95% of all movements tended to increase slightly, depending on the length of simulation run. The mean number of high risk movements that occurred over the 100 km radius was 3.4.

SORENSEN, K.L., MADEKUROZWA, R.L., DAWE, P.

Texto en inglés. *Veterinary Microbiology*, 32(3-4): 253-265, 1992. Veterinary Research Laboratory, P.O. Box 8101, Causeway, Harare, Zimbabwe.

Fiebre aftosa: la detección de anticuerpos en sueros bovinos por la prueba ELISA de bloqueo.

Se desarrolló una prueba ELISA de bloqueo para la detección de anticuerpos contra el virus de la fiebre aftosa tipos SAT1, SAT2 y SAT3, y para la cuantificación de anticuerpos en una sola dilución de suero. Se utilizó el sistema avidina-biotina. La prueba fue comparada a la ELISA de fase líquida ejecutada en el Laboratorio Mundial de Referencia para la Fiebre Aftosa. Se descubrió que proporciona una logística favorable y combina una alta especificidad con alta sensibilidad. La prueba cuantitativa usando una sola dilución de suero resultó también en una economía de recursos, y se consideró como un método confiable y exacto para la evaluación de niveles de anticuerpos.

Foot-and-mouth disease: detection of antibodies in cattle sera by blocking ELISA.

A blocking ELISA was developed for the detection of antibodies to foot-and-mouth disease virus SAT1, SAT2 and SAT3 and for the quantification of antibodies on a single dilution of serum. The avidin-biotin system was used. The test was compared with the liquid-phase ELISA executed at the World Reference Laboratory for foot-and-mouth disease. It was found to have favourable logistics and combined high specificity with high sensitivity. The quantitative test using a single dilution of serum was resource saving and was thought to be a reliable and precise method for the assessment of antibody levels.

THOMSON, G.R., VOSLOO, W., ESTERHUYSEN, J.J., BENGIS, R.G.

Texto en inglés. *Revue Scientifique et Technique - Office International des Epizooties*, 11 (4): 1097-1107, 1992. In: *Vet. Bull.*, 63 (1), 1993. FMDV Laboratory, Veterinary Research Institute, Onderstepoort 0110, South Africa.

Mantenimiento del virus de la fiebre aftosa en búfalos (*Synceros caffer* Sparrman, 1779) en Africa del Sur.

Usando las tasas de infección relacionadas con la edad, derivadas de datos serológicos en modelos disponibles de simulación determinística y de simulación estocástica, estos especialmente desarrollados, fue posible comprobar que las tasas básicas de reproducción del aftovirus tipo SAT (South African Territory), prevalente en búfalos, son altas. Los modelos predicen una periodicidad de infección en las manadas y, posiblemente, en la población como un todo. Por lo tanto, se concluye que las manadas de búfalos se encuentran más infecciosas en ciertas épocas que en otras. Sin embargo, ya que la mayoría de las infecciones en búfalos tiende a no ser aparente, es difícil que tales episodios sean identificados. El secuenciamiento de parte del gen ID de aislamientos derivados de

Maintenance of foot and mouth disease viruses in buffalo (*Synceros caffer* Sparrman, 1779) in Southern Africa.

Using age-related infection rates derived from serological data in available deterministic and specially developed stochastic simulation models, it was possible to establish that the basic reproductive rates for South African Territory (SAT) type foot and mouth disease virus in buffalo are high. The models predict that there is a periodicity of infection within herds and possibly the population as a whole. Thus, it is concluded that buffalo herds are likely to be more infectious at some times than at others. However, because most infections in buffalo are inapparent, such episodes are difficult to identify. Sequencing part of the ID gene of buffalo isolates and establishing antigenic profiles with neutralising monoclonal antibodies and conventional antisera showed that there is wide

búfalos, y el establecimiento de perfiles antigénicos con anticuerpos monoclonales neutralizantes y antisuero convencional, indicaron la existencia de una amplia variación intratípica en las poblaciones del virus tipo SAT que circulan en búfalos.

intratypic variation within the SAT type virus populations circulating in buffaloes.

VILLAVERDE, A., MARTINEZ, M.A., SOBRINO, F. DOPAZO J., MOYA, A., DOMINGO, E.

Texto en inglés. *Gene*, 103 (2): 147-153, 1991. In: *Virol. & AIDS Abst.*, 26 (5), 1993. CBM-UAM, Canto Blanco, 28049 Madrid, España.

Fijación de mutaciones en el gen VP1 del virus de la fiebre aftosa: ¿pueden las cuasispecies definir un reloj molecular transitorio?

La cantidad de sustituciones de nucleótidos (nt) encontrada en el gen VP1 (que codifica para la proteína de la cápside vírica entre dos de los 16 aislamientos estrechamente relacionados del virus de la fiebre aftosa ha sido cuantificada como una función del intervalo de tiempo entre los aislamientos. Uno de ellos (aislamiento C-S12) incluye algunas sustituciones encontradas en aislamientos anteriores y otras sustituciones encontradas en aislamientos posteriores. El estudio ha revelado la existencia de periodos alternativos de evolución rápida y de estabilidad genética relativa del VP1. Proponemos que tal constancia pueda ser la consecuencia de muestras de mutantes obtenidas al azar de las cuasispecies del virus de la fiebre aftosa, seguido de su amplificación en huéspedes susceptibles (para generar una nueva cuasispecie). Los eventos sucesivos de muestreo y amplificación pueden resultar en una acumulación constante de mutaciones.

Fixation of mutations at the VP1 gene of foot-and-mouth disease virus. Can quasispecies define a transient molecular clock?

The number of nucleotide (nt) substitutions found in the VP1 gene (encoding viral capsid protein) between any two of 16 closely related isolates of foot-and-mouth disease virus (FMDV) has been quantified as a function of the time interval between isolations. One of them (isolate C-S12) includes some replacements found in isolates that preceded it and other replacements found in later isolates. The study has revealed alternating periods of rapid evolution and of relative genetic stability of VP1. We propose that such constancy may be a consequence of random sampling of mutants from the FMDV quasispecies, followed by their amplification in susceptible hosts (to generate a new quasispecies). Successive sampling and amplification events may result in a steady accumulation of mutations.

Reconocimientos

El Comité Editorial agradece el aporte de Maria da Penha Monteiro da Silva y Perla García 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 Ivanildo de Azevedo, A. A. Gomes, y C.A.C. de Paulo.

Acknowledgements

The Editorial Committee is grateful to Maria da Penha Monteiro da Silva and Perla García Vaccaro (editing and proofreading), Astrid Rocha Pimentel (bibliography), Ronaldo de Albuquerque (photography) and Carla Prete Gonçalves (dactilography). Photolithography, printing and binding were performed by Ivanildo de Azevedo, A. A. Gomes, and C.A.C. de Paulo.

Bibliografía sobre enfermedades vesiculares

Bibliografy on vesicular diseases

- AKTAS, S., MACKAY, D., HAMBLIN, C., CROWTHER, J.R.
Biotinylated VIAA of FMD virus as an antigen in ELISA. In: *FAO. Rep. Ses. Res. Gp. Stand. Tech. Com. Eur. Comm. Control FMD*. Mittelhäusern, Switzerland, 8-11 Sep. 1992. p. 83-89.
- ALONSO, A., MARTINS, M.A., GOMES, M. da P.D., ALLENDE, R., SÖNDAHL, M.S.
Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection, typing, and subtyping of vesicular stomatitis virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 3: 287-292, 1991.
- ALONSO, A., MARTINS, M.A., GOMES, M. da P.D., ALLENDE, R., SÖNDAHL, M.S.
Foot-and-mouth disease virus typing by complement fixation and enzyme-linked immunosorbent assay using monovalent and polyvalent antisera. *J. Vet. Diag. Invest.*, 4 (3): 249-253, 1992. Pan American Foot-and-Mouth Disease Center (PAHO/WHO), PO Box 589, 20001-970, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
- AMADORI, M., ARCHETTI, I.L. TOLLIS, M., BUONAVOGLIA, C., PANINA, G.F.
Potency assessment of foot-and-mouth disease vaccines in cattle by means of antibody assays. *Biologicals*, 19 (3): 191-196, 1991. In: *Virol. & AIDS Abst.*, 26 (1), 1993.
- AMADORI, M., BERNERI, C., LODETTI, E.
Preparation, storage and potency testing of concentrated, inactivated, FMDV antigens. In: *FAO. Rep. Ses. Res. Gp. Stand. Tech. Com. Eur. Comm. Control FMD*. Mittelhäusern, Switzerland, 8-11 Sep. 1992, App. 2, p. 20-22.
- ARCHETTI, I.L. AMADORI, M., DONN, A., LODETTI, E.
Antibody response in oropharyngeal fluids of FMD vaccinated and infected cattle. In: *FAO. Rep. Ses. Res. Gp. Stand. Tech. Com. Eur. Comm. Control FMD*. Mittelhäusern, Switzerland, 8-11 Sep. 1992.
- ARMSTRONG, R.M., SAMUEL, A.R., KNOWLES, N.J., ULUTURK, S.
Genetic studies on FMD viruses isolated from samples collected in Turkey. In: *FAO. Rep. Ses. Res. Gp. Stand. Tech. Com. Eur. Comm. Control FMD*. Mittelhäusern, Switzerland, 8-11 Sep. 1992. App. 11. p. 64-69.
- ASTUDILLO, V.M.
A febre aftosa na América do Sul. (La fiebre aftosa en la América del Sur). *Hora Veterinária*, 12 (70): 16-22, 1992. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, Caixa Postal 589, 20001-970 Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- BARNETT, P.V., DOEL, T.R.
Stability and potency studies with FMD vaccines prepared from antigens stored in the Pirbright Banks: comparisons between oil and A1 (OH) formulations. In: *FAO. Rep. Ses. Res. Gp. Stand. Tech. Com. Eur. Comm. Control FMD*. Mittelhäusern, Switzerland, 8-11 Sep. 1992. App. 4. p. 25-29.
- BECKER, Y.
The use of computer analysis of foot and mouth disease virus (FMDV) capsid proteins to determine properties of putative antigenic domains in serotypes. *Israel J. Vet. Med.*, 47 (4): 136-142, 1992. Faculty of Medicine, Hebrew University, Jerusalem, Israel.

BELSHAM, G.J.

Distinctive features of foot-and-mouth disease virus, a member of the picornavirus family; aspects of virus protein synthesis, protein processing and structure. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 60(3):241-260, 1993. In: *Vet. Bull.*, 63 (11), 1993. AFRC Institute for Animal Health, Pirbright, Woking, Surrey GU24 ONF, UK.

BERENTSEN, P.B.M., DUKHUIZEN, A.A., OSKAM, A.J.

A critique of published cost-benefit analyses of foot-and-mouth disease. *Prev. Vet. Med.*, 12(3-4):217-227, 1992. Department of Agricultural Economics, Wageningen Agricultural University, Hollandseweg 1, 6706 KN Wageningen, Netherlands.

BERENTSEN, P.B.M., DUKHUIZEN, A.A., OSKAM, A.J.

A dynamic model for cost-benefit analyses of foot-and-mouth disease control strategy. *Prev. Vet. Med.*, 12 (3-4):229-243, 1992. Department of Farm Management, Wageningen Agricultural University, Hollandseweg 1, 6706 KN Wageningen, Netherlands.

BERENTSEN, P.B.M., DUKHUIZEN, A.A., OSKAM, A.J.

Foot-and-mouth disease and export, an economic evaluation of preventive and control strategies for The Netherlands. *Wageningse Economische Studies*, 20: 89 pp. 1990. In: *Vet. Bull.*, 63 (3), 1993. Agricultural University, 6700 A.A. Wageningen, Netherlands.

BERGMANN, I.E., AUGÉ DE MELLO, P., NEITZERT, E., BECK, E., GOMES, I.

Diagnosis of persistent aphthovirus infection and its differentiation from vaccination response in cattle by use of enzyme-linked immunoelectrotransfer blot analysis with bioengineered nonstructural viral antigens. *Am. J. Vet. Res.*, 54(6): 825-831, 1993. Pan American Foot-and-Mouth Disease Center (PAHO/WHO), PO Box 589, 20001-970, Rio de Janeiro, Brasil.

BLACKWELL, J.H., RICKANSRUD, D.A.

Ingredient effects on the thermal inactivation of foot-and-mouth disease virus formulated, comminuted meat products. *J. Food Science*, 54 (6): 1479-1484, 1989. In: *Index Vet.*, 61 (2), 1993.

BROWN, C.C., MEYER, R.F., OLANDER, H.J., HOUSE, C., MEBUS, C.A.

A pathogenesis study of foot-and-mouth disease in cattle, using *in situ* hybridization. *Can. J. Vet. Res.*, 56(3): 189-193, 1992. Foreign Animal Disease Diagnostic Laboratory, National Veterinary Service Laboratories, APHIS-USDA, P.O. Box 848, Greenport, NY 11944, USA.

BROWN, F.

New approaches to vaccination against foot-and-mouth disease. *Vaccine*, 10 (4): 1022-1026, 1992. United States Department of Agriculture, PO Box 848, Greenport, NY 11944-0848, USA.

BUTCHAIHAH, G., CARD, J.L., MORGAN, D.O.

Antigenic relationships of foot-and-mouth disease virus serotype Asia-1 isolates demonstrated by monoclonal antibodies. *Vet. Immunol. Immunop.*, 30 (2-3): 275-292, 1992. Southern Regional Station, Indian Veterinary Research Institute, Bangalore 560 024, India.

CALLIS, J.J., GREGG, D.A.

Foot-and-mouth disease. In: CASTRO, A.E., HEUSCHELE, W.P., ed. *Veterinary diagnostic virology: a practitioners guide*. St. Louis, USA, Mosby Year Book Inc., 1992. p. 100-103 In: *Index Vet.*, 54 (6), 1993.

CHAMNANPOOD, P., GLEESON, L.

Investigation into the role of goats and sheep in the epidemiology of foot-and-mouth disease in Northern Thailand. *Thai J. Vet. Med.*, 22 (4): 217-231, 1992. In: *Vet. Bull.*, 63 (6), 1993. Department of Livestock Development, Northern Veterinary Research and Diagnostic Centre, Hang Chat, Lampang 52190, Thailand.

COLLING, A.

[Detection of aphthovirus infection-associated antibodies by an indirect competitive ELISA and by immunodiffusion.] Nachweis von VIA- (virus-infection-associated) Antikörpern bei Rindern mittels indirektem Sandwich Kompetitions-ELISA und Immundiffusionstest. München, Germany, Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität, 1991. 115 p. (Inaugural Dissertation). In: *Index Vet.*, 61 (7), 1993.

COUACY-HYMAN, E., FORMENTY, P., ZIGBE, B., QUATTARA, M., CACOU, P.M.

[Note on a recent outbreak of foot and mouth disease in the Côte d'Ivoire.] Note sur une épizootie récente de fièvre aphteuse en Côte-d'Ivoire. *Rev. d'Élevage Méd. Vét. des Pays Trop.*, 44 (4): 423-424, 1991. In: *Index Vet.*, 61 (8), 1993. Laboratoire Central Pathologie Animale, BP 206, Bingeville, Côte d'Ivoire.

CROWTHER, J.R., FARIAS, S., CARPENTER, W.C., SAMUEL, A.R.

Identification of a fifth neutralizable site on type O foot-and-mouth disease virus following characterization of single and quintuple monoclonal antibody escape mutants. *J. Gen. Virol.*, 74 (8): 1547-1553, 1993. AFRC Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory, Ash Road, Pirbright, Surrey GU24 0NF, UK.

CURRY, S., ABU-GHAZALEH, R., BLAKEMORE, W., FRY, E., JACKSON, T., KING, A., LEA, S.,

LOGAN, D., NEWMAN, J., STUART, D.

Crystallization and preliminary X-ray analysis of three serotypes of foot-and-mouth disease virus. *J. Mol. Biol.*, 228 (4): 1263-1268, 1992. In: *Virol. & AIDS Abst.*, 26 (6), 1993. Lab. Mol. Biophys., Rex Richards Build., South Parks Rd., Oxford OX1 3QU, UK.

DEKKER, A., TERPSTRA, C., BARTELING, S.J.

Antibody kinetics and protection after challenge of FMD vaccines formulated from stored antigen. In: *FAO. Rep. Ses. Res. Gp. Stand. Tech. Com. Eur. Comm. Control FMD*. Mittelhäusern, Switzerland, 8-11 Sep. 1992. App. 3. p. 23-24.

DHANALAKSHMI, K., KRISHNASWAMY, S.

Application of the micro-neutralization test for the detection of foot and mouth disease antibodies in vaccinated bovines. *Cheiron*, 21 (1-2): 5-8, 1992. In: *Vet. Bull.*, 63 (1), 1993. Andhra Pradesh Agricultural University, Hyderabad-30, India.

DIAS, L.E., MUZIO, F.

[The foot and mouth disease programme in Uruguay.] El programa de la fiebre aftosa en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, 27 (113): 15-24, 1992. Dirección de Sanidad Animal, Colonia 892, 7° piso, Montevideo, Uruguay.

DIMITRIADIS, I., BROVAS, D., DRIZOS, E., MARKACIS, O., DELIMPALTAS, P., POLITAKIS, N. [First outbreak of foot and mouth disease type Asia1 in Greece (June, 1984).] *Deltion tes Ellenikes Kteniatrikes Eteireias = Bulletin of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 41 (4): 217-226, 1990. In: *Index Vet.*, 61 (1), 1993.

DOEL, T.R., BARNETT, P.V.

Rate of development of protection in cattle given "emergency" vaccination against FMD. In: *FAO. Rep. Ses. Res. Gp. Stand. Tech. Com. Eur. Comm. Control FMD*. Mittelhäusern, Switzerland, 8-11 Sep. 1992. app. 5. p. 30-31.

DOMINGO, E., MATEU, M.G., DIEZ, J., HOLGUIN, A., SOBRINO, F., MARTINEZ, M.A.

Antigenic variation of FMDV does not require immune selection. (Abstract). In: *FAO. Rep. Ses. Res. Gp. Stand. Tech. Com. Europ. Comm. Control FMD*. Mittelhäusern, Switzerland, 8-11 Sep. 1992. p. 97.

DOMINI, G., DOVIS, M., DE SIMONE, F., UGHI, L., PACCIARINI, M.L.

Detection of FMDV by polymerase chain reaction amplification and capture hybridization in microplates wells. In: *FAO. Rep. Ses. Res. Gp. Stand. Tech. Com. Eur. Comm. Control FMD*. Mittelhäusern, Switzerland, 8-11 Sep. 1992.

- DONALDSON, A.I.
Foot-and-mouth disease in Italy. *Vet. Rec.*, 132 (11): 282, 1992. Pirbright Laboratory, Ash Road, Pirbright, Woking, Surrey GU24 ONF, UK.
- DONALDSON, A.I.
Foot-and-mouth disease and swine vesicular disease in pigs: the risks for the U.K. after 1992. *Pig Vet. J.*, 25: 17-27, 1990. In: *Index Vet.*, 61 (8), 1993.
- DONALDSON, A.I., DOEL, T.R.
Foot-and-mouth disease: the risk for Great Britain after 1992. *Vet. Rec.*, 131 (6): 114-120, 1992. AFRC Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory, Ash Road, Pirbright, Woking, Surrey, GU24 ONF, UK.
- ELENA, S.F., GONZALEZ-CANDELAS, F., MOYA, A.
Does the VP₁ gene of foot-and-mouth disease virus behave as a molecular clock? *J. Mol. Evol.*, 35 (3): 223-229, 1992. In: *Virology & AIDS Abstracts*, 26 (4), 1993. Dep. Genet. and Serv. Bioinform., Fac. Cienc. Biol., Univ. Valencia, Dr. Moliner 50, Burjassot, 46100 Valencia, España.
- FEDIDA, M., DANNACHER, G., COUDERT, M., BELLI, P.
[Prevention of foot and mouth disease: a success?] Prophylaxie de la fièvre aphteuse: un succès? *Sci. Vét. Méd. Comparée*, 94 (3): 207-225, 1992. In: *Index Vet.*, 61 (6), 1993.
- FLECKINGER, R.
Evolution commentée de la fièvre aphteuse en France (1919-1991). *Bull. Acad. Vét. de France*, 65 (3): 339-354, 1992. Seine Maritinde, 76300 Sotteville-lés Rouen, 47 avenue des Canadiens.
- FONDEVILLA, N.A., FRICK, E., LÓPEZ, A.G., O'DONELL, V.K., SMITSAART, E.N., MARCOVECCHIO, F., SCHUDEL, A.A.
[Response to an oil adjuvanted vaccine against foot-and-mouth disease virus in pigs. Immunogenic behaviour and tolerance.] Respuesta a una vacuna oleosa inactivada en porcinos. Comportamiento inmunogénico y tolerancia. *Veterinaria Argentina*, 10 (91): 26-29, 1993. In: *Vet. Bull.*, 63 (8), 1993. Instituto de Virología, Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, INTA, Argentina.
- FORBES, R.N.
Application of subjective methods for the determination of risks involved with foot and mouth disease outbreak. In: *Papers presented at the New Zealand Branch, Australian Agricultural Economics Society sixteenth annual conference, Lincoln University, August 1991*. Canterbury, New Zealand. *Discussion Paper - Agribusiness & Economics Research Unit, Lincoln University* N° 131, 12pp. In: *Index Vet.*, 61 (3), 1993.
- GOURREAU, J.M., GRÜNWALD, P., PERRET, M., GUIDONI, M.
[What is your diagnosis? (foot and mouth disease in a friesian heifer.)] Quel es votre diagnostic? *Point Vétérinaire*, 25 (152): 169-171, 1993. In: *Index Vet.*, 61 (8), 1993.
- GUGIU, I., CHICIUDEAN, I., DANES, M., GRUIA, M., MALINETESCU, M.
FMDV ultrafiltration concentration. *Studies Res. Vet. Med.*, 1 (1): 45-48, 1992. In: *Vet. Bull.*, 63 (10), 1993. Pasteur National Institute for Veterinary Medicine, Calea Giulesti n° 333, sector VI, 77826 Bucharest, Romania.
- GUGIU, I., MALINETESCU, M., CHICIUDEAN, I., DANES, M.
FMDV chemicals concentration. *Studies Res. Vet. Med.*, 1 (1): 39-43, 1992. In: *Vet. Bull.*, 63 (10), 1993. Pasteur National Institute for Veterinary Medicine, Calea Giulesti n° 333, sector VI, 77826 Bucharest, Romania.

HAVE, P., ESKILDSEN, M.

Experience with FMDV antibody ELISA in the control of cattle imported from vaccinating countries. In: *FAO. Rep. Ses. Res. Gp. Stand. Tech. Com. Eur. Comm. Control FMD*. Mittelhäuser, Switzerland 8-11 Sep. 1992. app. 8. p. 45-47.

HERNANDEZ, J., MARTINEZ, M.A., ROCHA, E., DOMINGO, E., MATEU, M.G.

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.

KALANIDHI, A.P., NAGAI AH, K., PALANISAMY, R., SRINIVASAN, V.A.

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: *Virol. & AIDS Abst.*, 26 (7), 1993. Indian Immunol., Hyderabad 500 133, India.

KAZLAUSKIENE, N., DEVADOSS, S., MEYERS, W.H.

An adaptive policy simulation model to analyse price reforms for Lithuanian food and agricultural products. *CARD Technical Report Series*, (91-TR20), 1991. In: *Index Vet.*, 61 (2), 1993. Ames, Yowa, USA; Center for Agricultural and Rural Development.

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 (1-2): 1-17, 1991. Div. Biochem. Virol., Baylor Coll. Med. Houston, TX77030, USA.

KITCHING, R.P.

The excretion of foot-and-mouth disease virus by vaccinated animals. *State Vet. J.*, 2 (3): 7-11, 1992. In: *Index Vet.*, 61 (8), 1993.

KLEINA, L.G., GRUBMAN, M.J.

Antiviral effects of a thiol protease inhibitor on foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.*, 66 (12): 7168-7175, 1992. Plum Island Animal Disease Center, North Atlantic Area, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, PO Box 848, Greenport, NY 11944-0848, USA.

KREBS, O., AHL, R., STRAUB, O.C., MARQUARDT, O.

Amino acid changes outside the G-H loop of capsid protein VP₁ of type O foot-and-mouth disease virus confer resistance to neutralization by antipeptide G-H serum. *Vaccine 11* (3): 359-362, 1993. Federal Research Centre for Virus Diseases of Animals, PO Box 1149, D-7400 Tübingen, Germany.

LEÓN, E.A., DUFFY, S.J., HOMSE, A.

[Effect of foot and mouth disease vaccination on weight gain in cattle.] Efecto de la vacunación antiaftosa en la ganancia de peso en bovinos. *Vet. Argentina*, 9 (89): 609-611, 1992. In: *Vet. Bull.*, 63 (5), 1993. Instituto de Patobiología C.I.C.V., INTA, CC77, CP1708, Morón, Argentina.

LOCHER, F., TRATSCHIN, J.D., HOFMANN, M., KIHNM, U.

Rapid diagnosis of FMDV by PCR and characterization of viruses isolates by nucleotide sequencing. In: *FAO. Rep. Ses. Res. Gp. Stand. Tech. Com. Eur. Comm. Control FMD*. Mittelhäuser, Switzerland, 8-11 Sep. 1992. p. 48-54.

LOGAN, D., ABU-GHAZALEH, R., BLAKEMORE, W., CURRY, S., JACKSON, T., KING, A., LEA, S., LEWIS, R., NEWMAN, J., PARRY, N., ROWLANDS, D., STUART, D., FRY, E.

Structure of a major immunogenic site on foot-and-mouth disease virus. *Nature*, 362 (6420): 566-568, 1993. Laboratory of Molecular Biophysics, Rex Richards Building, University of Oxford, South Parks Road, Oxford OX1 3QU, UK.

LOMBARD, M.

[The setting up of a bank of frozen antigens and urgent preparation of foot and mouth disease vaccines.] Constitution d'une banque d'antigènes congelés et préparation d'urgence des vaccins antiaphteux. *Ann. Méd. Vét.*, 136 (7): 523-524, 1992. In: *Index Vet.*, 61 (3), 1993. Fr., Meeting of the European Association of Animal Health.

MACKAY, D.K.J., BARNETT, I.T.R., KITCHING, R.P.

FAO Collaborative study: phase XII. In: *FAO. Rep. Ses. Res. Gp. Stand. Tech. Com. Eur. Comm. Control FMD*. Mittelhäusern, Switzerland, 8-11 Sep. 1992. App. 6. p. 32-37.

MADDARENA, E.F., MODENA, C.M., FIGUEIREDO, M.C.P.

Reavaliação das áreas endêmicas primárias de febre aftosa em Minas Gerais, Brasil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, 44 (6): 473-484, 1992. UFMG. Escola Veterinária, Caixa Postal 567 - CEP 30.101 Belo Horizonte, MG, Brasil.

MARQUARDT, O.

Foot-and-mouth disease virus proteinase 3C inhibits translation in recombinant *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 107 (2-3): 279-285, 1993. In: *Vet. Bull.*, 63 (6), 1993. Federal Research Centre for Virus Diseases of Animals, P.O. Box 1149, D-7400 Tübingen, Germany.

MARQUARDT, O.

Methods that identify recombinant FMDV strains. In: *FAO. Rep. Ses. Res. Gp. Stand. Tech. Com. Eur. Comm. Control FMD*. Mittelhäusern, Switzerland, 8-11 Sep. 1992. App. 13. p. 75-77.

MARUSI, A., BRINDANI, F., SERRA, A.

[Immunoglobulins and pregnancy in cows.] Immunoglobuline e gravidanza nella bovina. *Atti della Società Italiana di Buiatria*, 24: 565-574, 1992. In: *Vet. Bull.*, 63 (4), 1993. Istituto di Clinica Ostetrica e Ginecologica Veterinaria, Parma, Italia.

McCULOUGH, K., SCHAFFNER, R., BRUCKNER, L., MULLER, H., KIHM, U.

Immunological activity in protected and unprotected animals following FMDV infection. In: *FAO. Rep. Ses. Res. Gp. Stand. Tech. Com. Europ. Comm. Control FMD*. Mittelhäusern, Switzerland, 8-11 Sep. 1992.

MISRA, L.D., LAL, S.M.

Physico-chemical analysis of bentonite and its application as an adsorbant for foot-and-mouth disease virus. *Indian J. Virol.*, 7 (1): 46-52, 1991. In: *Vet. Bull.*, 63 (4), 1993. Indian Veterinary Research Institute Hebbal, Bangalore-560 024, India.

MISRA, L.D., LAL, S.M., SRISHNAMURTHY, B.L.

Antibody response in dairy cattle to inactivated polyvalent foot-and-mouth disease vaccine adjuvanted with bentonite and saponin. *Indian Vet. Med. J.*, 15 (1): 1-6, 1991. In: *Index Vet.*, 61 (1), 1993. Indian Vet. Res. Inst., Hebbal, Bangalore 560 024 India.

MISRA, L.D., LAL, S.M., NEGI, B.S.

Bentonite as an adjuvant in the inactivated foot and mouth disease vaccine. *Indian Vet. J.*, 68 (11): 1007-1011, 1991. In: *Virol. & AIDS Abst.*, 26 (3), 1993. Indian Vet. Res. Inst., Hebbal, Bangalore 560 024 India.

- MULCAHY, G., REID, E., DIMARCHI, R.D., GALE, C., DOEL, T.R.
Maturation of functional antibody affinity in animals immunised with synthetic foot-and-mouth disease virus. *Res. Vet. Sci.*, 52 (2): 133-140, 1992. AFRC Institute for Animal Health, Ash Road, Pirbright, Woking., Surrey GU24 0NF, UK.
- NAIR, S.P.
Studies on the immune response of oil adjuvanted foot and mouth disease inactivated vaccine in laboratory animals. *Indian Vet. J.*, 68 (5): 489-490, 1991. In: *Index Vet.*, 61 (12), 1993.
- NAIR, S.P., SEN., A.K.
A comparative study of the immune responses of sheep against foot-and-mouth disease virus types Asia-1 and O PEG-concentrated aluminium hydroxide gel and oil-adjuvanted vaccines. *Vaccine*, 11 (7): 782-786, 1993. Indian Veterinary Research Institute, Hebbal, Bangalore 560 024, India.
- NAIR, S.P., SEN., A.K.
Growth studies on foot-and-mouth-disease virus type "O" in different cell systems. *Indian J. Ani. Sci.*, 62 (8): 707-710, 1992. In: *Vet. Bull.*, 63 (4), 1993. Indian Veterinary Research Institute, Bangalore, Karnataka 560 024, India.
- NAIR, S.P., SEN., A.K.
Preliminary studies on biological characteristics of plaque variants of foot and mouth disease virus type Asia-1. *Indian Vet. J.*, 68 (12): 1188-1189, 1991. In: *Vet. Bull.*, 63 (2), 1993. Indian Veterinary Research Institute, Hebbal, Bangalore 560 024, India.
- NAIR, S.P., SEN, A.K.
A study on the immune response of sheep to foot-and-mouth disease virus vaccine type "O" prepared with different inactivants and adjuvants. *Acta Virol.*, 36 (5): 473-478, 1992. Indian Veterinary Research Institute, Hebbal, Bangalore 560 024, India.
- PACHECO, A.B.F., BRINDEIRO, R.M., SOARES, M.A., ALMEIDA, D.F. de, TANURI, A.
The N-terminal amino acid sequence is essential for foot-and-mouth disease virus replicase activity. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 25 (7): 659-666, 1992. In: *Virol. & AIDS Abst.*, 26 (3), 1993. Dep. Genet., Inst. Biol., CCS, Bloco A, Univ. Fed. Rio de Janeiro, 21941 Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- PACHECO, A.B.F., BRINDEIRO, R.M., SOARES, M.A., ALMEIDA, D.F. de, TANURI, A.
In vitro activities of a recombinant foot-and-mouth disease virus replicase expressed in *Escherichia col.* *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 25 (8): 761-776, 1992. In: *Virol. & AIDS Abst.*, 26 (3), 1993. Dep. Genet., Inst. Biol., Univ. Fed. Rio de Janeiro, 21949-900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- PARMAR, K.S., MEHTA, V.M.
Effect of early foot-and-mouth-disease vaccination on leukocytes response in neonatal buffalo calves. *Indian J. Ani. Sci.*, 61 (4): 393-395, 1991. In: *Vet. Bull.*, 63 (1), 1993. Gujarat Agricultural University, Anand, Gujarat 388 110, India.
- PATNAIK, B., RAI, D.V., VENKATARAMANAN, R.
Antibody response to proteolytically cleaved 146 S particles of foot-and-mouth disease virus. *Indian J. Ani. Sci.*, 61 (11): 1155-1159, 1991. In: *Vet. Bull.*, 63 (1), 1993. Indian Veterinary Research Institute, Mukteswar-Kumaon, Uttar Pradesh 263 138, India.
- PRABHUDAS, K., BUTCHAIHAH, G., RAMACHANDRAN, S.P., RAO, B.U.
Characterization of aphthovirus type Asia-1 isolates of Indian origin using monoclonal antibodies. *Cur. Sci.*, 64 (3): 184-187, 1993. In: *Vet. Bull.*, 63 (8), 1993. Indian Veterinary Research Institute, Bangalore 560 024, India.

- PRASAD S., ARVIND KUMAR, AHUJA, K.L., SHARMA R.
Prevalence of foot-and-mouth disease virus types in north-west India (1985-87). *Indian J. Virol.*, 8 (1): 49-52, 1992. In: *Vet. Bull.*, 63 (5), 1993. Department of Veterinary Microbiology, College of Veterinary Sciences, Haryana Agricultural University, Hisar-125 004, India.
- PRIGODA, A.S., KORENEVA, A.L., KONOVALOVA, E.YU., SAFONOV, G.A., KALININA, T.A., BULGAKOVA, E.I.
Design of serum-free nutrient medium for culturing mammalian cells. IV. Culturing of established cell line VNK-21 on low-serum nutrient data. *Soviet Biotechnology*, 5: 78-83, 1991. In: *Index Vet.*, 61 (5), 1993. All-Union Research and Development Institute of Applied Biochemistry, Moscow 125299, Russia.
- RAHMAN, M.B., CHOWDHURY, S.M.Z.H., RAHMAN, M.F., RAHMAN, M.M.
Application of an enzyme-linked immunosorbent assay for typing and subtyping of foot and mouth disease virus in Bangladesh. *Bangladesh Veterinarian*, 8 (1-2): 8-10, 1991. In: *Vet. Bull.*, 63 (1), 1993. Animal Health Research Division, Bangladesh Livestock Research Institute, Savar, Dhaka, Bangladesh.
- RALPH, W.
Improved tests for foot and mouth disease. *Rural Research*, 147: 20-24, 1990. In: *Index Vet.*, 61 (1), 1993.
- RANA, S.K., NAG, N.C., BHATTACHARYA, H.M.
Typing of foot and mouth disease virus isolates in West Bengal during 1984-5. *Indian J. Virol.*, 7 (1): 111-113, 1991. In: *Vet. Bull.*, 63 (4), 1993. Bidhan Chandra Krishi Viswavidyalaya, Mohanapur, Distt. Nadia 741 252, India.
- REDDY, J.V., CHETTY, A.V., RAMACHANDRAIAH, S.V., SREERAMAN, P.K.
Effect of foot and mouth disease vaccination on semen quality in bulls. *Indian J. Ani. Reprod.*, 12 (1): 13-14, 1991. In: *Vet. Bull.*, 63 (2), 1993. Department of Animal Reproduction and Gynecology, College of Veterinary Science, Tirupati-517502, Andhra Pradesh, India.
- RIEDER ROJAS, E., CARRILLO, E., SCHIPPACASSI, M.
Modification of foot-and-mouth disease virus O₁ Caseros after serial passages in the presence of antiviral polyclonal sera. *J. Virol.*, 66 (6): 3368-3372, 1992. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Junín 956, 1113 Capital Federal, Buenos Aires, Argentina.
- RWEYEMAMU, M.M.
The changing face of foot-and-mouth disease (FMD) control. *British Vet. J.*, 148 (5): 365-367, 1992. In: *Index Vet.*, 61 (1), 1993. *PANVAC Vaccine Bull.*, 3 (2): 42-44, 1993.
- SANI, S.S., SHARMA, J.K., KWATRA, M.S.
Actinomyces pyogenes mastitis among lactating cows following foot-and-mouth disease. *Vet. Rec.*, 131 (7): 152, 1992. Department of Veterinary Public Health and Epidemiology College of Veterinary Science, Punjab Agricultural University, India 141 004.
- SAIZ, J.C., SOBRINO, F., DOPAZO, J.
Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus type O. *J. Gen. Virol.*, 74 (10): 2281-2285, 1993. Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, (CSIC-UAM), Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Cantoblanco, Madrid, España.
- SALT, J.S.
The carrier state in foot and mouth disease - an immunological review. *British Vet. J.*, 149 (3): 207-223, 1993. In: *Index Vet.*, 61 (10), 1993.

SAMUEL, A.R., FARIAS, S., CROWTHER, J.R.

Preliminary data on the characterisation of a FMDV type O multiple monoclonal antibody escape mutant which is not neutralised by polyclonal cattle antiserum. In: *FAO. Rep. Ses. Res. Gp. Stand. Tech. Com. Eur. Comm. Control FMD. Mittelhausern, Switzerland, 8-11 Sep. 1992. App. 10. p. 54-63.*

SEN, A.K., SAHA, S.N.

Problems of repeated outbreaks of foot-and-mouth disease type "O" in Southern Peninsula. *Indian J. Virol.*, 8 (2): 82-85, 1992. In: *Index Vet.*, 61 (12), 1993.

SHARMA, D.K., BARMAN, N.N., DAS, S.K., DUTTA, P.K., BORO, B.R.

Foot and mouth disease in the North Eastern parts of India in 1988-1990. *J. Assam Vet. Council*, 2: 74-76, 1992. In: *Index Vet.* 61 (3), 1993. All India Coordinated Research Project on FMD, Department of Microbiology, Assam Agricultural University, Khanapara Campus, Guwahati 781 022, Assam India.

SHARMA, D.K., DUTTA, P.K., HAZARIKA, A.K.

Foot and mouth disease in the North East of India during 1991. *Virus Information Exchange Newsletter for South-East Asia and the Western Pacific*, 9 (2): 63, 1992. In: *Index Vet.*, 61 (2), 1993.

SHARMA, S.K., SINGH, G.R., PATHAK, R.C.

Seasonal contours of foot-and-mouth disease in India. *Indian J. Ani. Sci.*, 61 (12): 1259-1261, 1991. In: *Vet. Bull.*, 63 (3), 1993. Chandra Shekhar Azad University of Agriculture and Technology, Mathura Campus, Uttar Pradesh 281 122 India.

SHIMSHONY, A.

Cattle health in Israel: present situation, challenges, and future prospects. *Isr. J. Vet. Med.*, 47 (4): 157-163, 1992. Veterinary Services and Animal Health, Ministry of Agriculture, P.O.B. 12. Bet-Dagan, Israel.

SINGH, B.K., MUKHERJEE, F., RAMA KANT, TONGAONKAR, S.S., RANA, S.K., SHIRVASTAVA, P.K.

Foot-and-mouth-disease virus type situation in some states of India during 1984 to 1988. *Indian J. Ani. Sci.*, 60 (3): 307-308, 1990. In: *Index Vet.*, 61 (1), 1993.

SKINNER, H.H.

The 1951-52 foot-and-mouth disease outbreaks in the UK. Lay criticisms of the control measures and research, and the official responses. *Vet. History*, 7 (3): 110-124, 1993. In: *Index Vet.*, 61 (10), 1993.

SKRZYPEK, W.

[Control of foot and mouth disease in Europe in XIXth and XXth centuries.] Walka z pryszczycza w Europie w XIX I XX wieku. *Medycyna Weterynaryjna*, 49 (5): 230-232, 1993. In: *Index Vet.*, 61 (8), 1993.

SOÓS, T.

[Problems of foot and mouth disease control.] A ragadós száj- és körömfájás elleni védekezési kérdése. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 47 (7): 326-341, 1992. In: *Index Vet.*, 61 (10), 1993. Állatgyógyászati Oltóanyag- és Gyógyszerellenőrző Intézet, Budapest, Szállás u. 8 H-1107, Hungary.

STROBBE, R.

[Decrease in immunity of the Belgian cattle population after the cessation of foot and mouth disease vaccination and the urgent need for vaccination.] Diminution de l'immunité du cheptel bovin belge après l'arrêt de la vaccination antiaphteuse et conditions d'une vaccination d'urgence. *Ann. Méd. Vét.*, 136 (7): 513-519, 1992. In: *Index Vet.*, 61 (3), 1993. Fr., Meeting of the European Association for Animal Health.

- SURYANARAYANA, V.V.S., RAO, B.U., PADAYATTY, J.D.
Nucleotide sequence of the cDNA and the derived amino acid sequence for the major antigenic protein of foot and mouth disease virus, type Asia 1 63/72. *Indian J. Biochemistry & Biophysics*, 29 (1): 20-24, 1992. In: *Vet. Bull.*, 63 (4), 1993. Indian Veterinary Research Institute, Hebbal, Bangalore 560 024, India.
- TARABLA, H.D.
[Weight gain in heifer calves inoculated with oil-adjuvant foot and mouth disease vaccine.] Evolución del peso corporal en terneras Holando Argentino inoculadas con vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso. *Vet. Argentina*, 9 (90): 672-675, 1992. In: *Vet. Bull.*, 63 (7), 1993. INTA, EEA Rafaela, CC 22, 2300 Rafaela, Santa Fé, Argentina.
- TISON, I., MERLIN, P.
Le plan d'intervention contre la fièvre aphteuse. *Bull. Acad. Vét. de France*, 65 (3): 389-396, 1992. 175, rue du Chevaleret - 75013, Paris, France.
- UMEHARA, O.
[Comparative study of the humoral immune response induced in young cattle by foot and mouth disease vaccines adjuvanted with avridine or primary oil emulsion.] Estudo comparativo da resposta imunitária humoral, induzida em bovinos jovens, pelo emprego de vacinas antiaftosa formuladas com avridine e com emulsão primária de óleo mineral. Thesis. *Univ. São Paulo, SP, Brasil*, 1991. 124 In: *Index Vet.*, 61 (12), 1993.
- VINDRINET, R.
Vaccination perifocale: efficacité dans la lutte antiaphteuse? I. Difficultés de l'évaluation - identification d'études de cas. *Bull. Acad. Vét. de France*, 65 (3): 301-306, 1992. Services Vétérinaires de Charante - Maritime - 17072, La Rochelle Cedex 9, France.
- VOLPINA, O., SUROVOY, A., GELFANOV, V., KAN, E., IVANOV, V.
Novel foot-and-mouth disease protective peptides; mechanism of immunostimulation. *UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology*, 84: 391-400, 1988. In: *Index Vet.*, 61 (3), 1993.
- VOSLOO, W., KIRKBRIDE, E., BENGINS, R.G., THOMSON, G.R.
Genome variation in SAT-1 and 2 viruses infecting buffalo in Southern Africa. In: *FAO. Rep. Ses. Res. Gp. Stand. Tech. Com. Eur. Comm. Control FMD*. Mittelhäusern, Switzerland, 8-11 Sep. 1992. App. 1. p. 12-19.
- VOSLOO, W., KNOWLES, N.J., THOMSON, G.R.
Genetic relationships between southern African SAT-2 isolates of foot-and-mouth-disease virus. *Epid. Inf.*, 109 (3): 547-558, 1992. In: *Vet. Bull.*, 63 (8), 1993. AFRC Institute for Animal Health, Pirbright, GU24 0NF, UK.
- WOODBURY, E.L., SAMUEL, A.R., KNOWLES, N.J.
Further analysis of FMD virus isolates from Saludi Arabia: the presence of mixed serotype infections In: *FAO. Rep. Ses. Res. Gp. Stand. Tech. Com. Eur. Comm. Control FMD*. Mittelhäusern, Switzerland, 8-11 Sep. 1992. App. 12. p. 70-74.

BOLETIN DEL CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA

INVITACIÓN A LOS AUTORES

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

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

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

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

Trabajo de revisión: Formato flexible.

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

INSTRUCCIONES A LOS AUTORES

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

COMITÉ EDITORIAL

Dr. Vicente Astudillo, Director
 Dr. Timothy R. Doel, Servicios de Laboratorio
 Dr. José G. Rodríguez Torres, Asistencia Técnica
 Dr. Víctor M. Varela-Díaz, Adiestramiento e Información

PAN-AMERICAN FOOT-AND-MOUTH DISEASE CENTER BULLETIN

INVITATION TO CONTRIBUTORS

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

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

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

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

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

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

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

1. All manuscripts presented to the BOLETIN should be typewritten and double-spaced on one side of 28 x 22 cm paper.
2. Author's name, title, institution and address should be given on a separate sheet.
3. Figures and tables (arabic numbers) with appropriate captions and titles should be included on separate pages, numbered consecutively and attached at the end of the text with an indication of where they belong.
4. References cited should be listed separately in alphabetical order with appropriate reference numbers in the text.
5. The 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.
6. Authors will receive the corresponding Boletin.

EDITORIAL COMMITTEE

Dr. Vicente Astudillo, Director
Dr. Timothy R. Doel, Laboratory Services
Dr. José G. Rodríguez Torres, Technical Assistance
Dr. Víctor M. Varela-Díaz, Training and Information