

Comunicación breve

USO DE UNA PROTEÍNA RECOMBINANTE DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA, LA POLIMERASA 3D, EN UNA PRUEBA DE INMUNODIFUSIÓN EN GEL DE AGAR

Bergmann Ingrid E.¹, Malirat Viviana¹, Falczuk Abraham², Sondahl Magnus S.¹

¹Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS)

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

²Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA)

Av. Fleming 1653, Martínez, Buenos Aires, Argentina

En este estudio, se examinó la efectividad del uso del polipéptido 3D recombinante, obtenido en su forma nativa en una prueba de IDGA (IDGA-3D), para uso en la detección de anticuerpos específicos de infección con VFA, independientemente de la condición de vacunación. Los resultados indican que en relación a la tradicional prueba de IDGA-VIAA, la IDGA 3D ofrece, particularmente cuando se evalúan sueros de bajo título, un método más consistente, con especificidad comparable, y por lo menos la misma sensibilidad. Ninguno de los antígenos ofreció una ventaja particular con respecto a la definición de las bandas de precipitación. El reemplazo del VIAA por la proteína 3D recombinante tiene considerables atracciones, dado que proporciona un suministro ilimitado de material inocuo, económico, de fácil purificación y consistente, eliminando la presencia potencial de antígenos no específicos de células BHK o componentes de la cápside del VFA.

El término “antígeno asociado a la infección viral” (VIAA) para el virus de la fiebre aftosa (VFA) se refiere convencionalmente a un complejo de proteínas no-estructurales identificado por Cowan y Graves (5), cuyo principal componente es la ARN polimerasa viral, proteína 3D (13).

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

La primera técnica descripta para la detección de anticuerpos anti-VIAA como indicio de infección previa con el VFA fue la prueba de inmunodifusión en gel de agar (IDGA) (8). Debido a la baja sensibilidad de este test, Alonso y colaboradores (3), desarrollaron un ensayo inmunoenzimático de ELISA en fase líquida (ELISA-VIAA) para identificar y cuantificar los anticuerpos contra el VIAA del VFA. Sin embargo, la mayor sensibilidad alcanzada mediante la aplicación de este tipo

de ensayo, en comparación con el IDGA-VIAA, generó un aumento en el número de resultados VIAA-positivos en ganado vacunado y reinmunizado con vacunas que contienen altas concentraciones de antígenos no purificados del VFA. Asimismo, la limitada reproducibilidad observada en las pruebas de VIAA (6), (I. Bergmann y colaboradores, comunicación personal) parece ser una propiedad inherente a la naturaleza semi-purificada de las preparaciones de VIAA, que están sujetas a variación en la calidad del antígeno entre los diferentes lotes. Además, la producción del antígeno convencional VIAA-VFA se realiza por purificación parcial a partir de suspensiones del virus producidas en cultivo de células de riñón de hamster jóvenes (BHK), para lo cual se requiere una unidad de laboratorio de alta seguridad, para el manejo del VFA (1,9).

Para superar las limitaciones mencionadas, el reemplazo del VIAA por un antígeno recombinante del VFA, la polimerasa 3D, tiene considerables atracciones, dado que proporciona un suministro ilimitado de material inocuo, económico, fácilmente purificable y consistente. Asimismo, este enfoque elimina la presencia potencial de cualquier antígeno no específico en las preparaciones del VIAA, como pueden ser proteínas derivadas de células BHK o componentes de la cápside del VFA, y que pueden ser reconocidos en la prueba de IDGA-VIAA por el suero de animales inoculados con vacunas producidas en BHK, llevando a resultados falso-positivos. En este estudio, se examinó la efectividad del uso del polipéptido 3D recombinante, obtenido en su forma nativa, construido y purificado como descripto previamente (10), en una prueba de IDGA (IDGA-3D), para la detección de anticuerpos específicos de infección con VFA,

independientemente de la condición de vacunación.

El estudio comparativo del uso del VIAA tradicional y del polipéptido recombinante 3D en la prueba de IDGA indica que ninguno de los dos antígenos ofreció ninguna ventaja particular con respecto a la definición de las bandas de precipitación. No se observó diferencia en la posición, intensidad, velocidad de formación y visibilidad de las bandas de precipitación.

La alta especificidad de la prueba de IDGA-3D puede ser observada por los resultados negativos obtenidos con 250 sueros de bovinos provenientes de áreas libres de FA. Por lo tanto, la alta especificidad del IDGA-VIAA fue mantenida al usar el antígeno recombinante.

El análisis mediante IDGA-3D de 60 sueros de bovinos involucrados en focos, sangrados entre 20 y 40 días después de la confirmación de la enfermedad, demostró resultados positivos. Por lo tanto, no se registra ninguna diferencia en la sensibilidad del test de IDGA-3D con respecto a la prueba IDGA-VIAA. La titulación de los sueros reactivos por la prueba de IDGA-3D daba valores entre 1 a 3 veces mayores que los conseguidos con la prueba de IDGA-VIAA, dependiendo de la preparación de VIAA utilizada. El análisis de sueros colectados secuencialmente de 4 bovinos persistentemente infectados indicó que independientemente del lote de 3D utilizado, la prueba de IDGA-3D detecta anticuerpos indicativos de replicación viral hasta aproximadamente 280 días después de la infección. Dicha fase de la infección pudo detectarse con una única de las cuatro

preparaciones de VIAA estudiadas. Estos resultados indican claramente la mayor consistencia de los resultados de IDGA obtenidos con el antígeno recombinante 3D, cuando comparados con aquellos obtenidos con la preparación del VIAA tradicional, particularmente al evaluar sueros de bajo título.

Seguidamente, los estudios se dirigieron a determinar si el IDGA-3D conseguía eliminar los resultados positivos obtenidos con el test de IDGA-VIAA con sueros de animales luego de la vacunación (2). Con este objetivo se examinó la reactividad de sueros con un número inesperadamente alto de resultados positivos por IDGA-VIAA. Se estudiaron muestras de bovinos sistemáticamente vacunados provenientes de regiones libres de FA durante por lo menos los últimos 3 años, que mostraban resultados positivos en el IDGA-VIAA aún en 61% (147/240) de los sueros obtenidos de animales > 2 años, y en 11% (22/207) de aquellos colectados de bovinos < de 2 años (pero mayores de seis meses), nacidos después del último foco de FA. De los sueros IDGA-VIAA-positivos en la población mayor y menor de 2 años de edad, 91% y 41%, respectivamente, reaccionaron también con la proteína recombinante 3D. La positividad total se redujo a 55% y 4% en los animales > y < de 2 años, respectivamente. Asimismo, se analizó la reactividad de sueros con un número inesperadamente alto de resultados IDGA-VIAA-positivos (78 de 90) obtenidos 30 días después de que una única dosis de vacuna fuera aplicada 120 días después de la vacunación inicial. Los antígenos de la vacuna habían sido obtenidos a partir de células BHK infectadas, crecidas en frascos roller y, a diferencia de lo que ocurre en los procedimientos de producción standard, estos

antígenos no se clarificaron y se concentraron cuatro veces. De los 78 sueros VIAA-positivos, 7 negativizaron en el IDGA-3D. También fueron analizados sueros experimentales de dos grupos de 20 bovinos, cada uno vacunado y revacunado dos veces en intervalos de 60-días, con vacunas preparadas con antígenos producidos en cultivos de células en suspensión y concentrados hasta 18 y 54 µg/5ml de dosis. La mayoría de los animales que eran IDGA-VIAA-positivos entre 15 y 30 días después de la revacunación confirmaron reactivos por IDGA-3D.

Los datos indicaron claramente que algunos de los resultados falso positivos por IDGA-VIAA en sueros de animales post-vacunados fueron eliminados por IDGA-3D. En la mayoría de los casos, sin embargo, la reactividad se mantuvo y probablemente representa existencia de anticuerpos anti-3D inducidos contra la ARN polimerasa presente en las preparaciones de la vacuna. De hecho, resultados de Rowlands y colaboradores (14) mostraron que antisuero producido en cobayos que habían recibido partículas purificadas de virus inactivo reaccionaban con antígeno VIAA aislado del virus. Una evidencia más reciente obtenida por microscopía electrónica indicó que la proteína 3D es un componente de por lo menos 20-30% de las partículas virales (11). La falta de reactividad contra 3D en muchos de los animales vacunados puede deberse a una concentración insuficiente del polipéptido 3D en las suspensiones virales, así como a la sensibilidad relativamente baja de la prueba de IDGA. En este contexto, el mismo antígeno recombinante 3D utilizado en pruebas inmunoenzimáticas (10), claramente mostró que existen anticuerpos contra 3D en el suero

de muchos animales vacunados. Tales reactividades son particularmente evidentes después de la revacunación. O'Donnell y colaboradores (12), usando otra proteína 3D recombinante expresada en bacteria demostró resultados positivos para anticuerpos anti-3D en forma transitoria en sueros de animales inmunizados con vacunas provenientes de uno de los dos productores probados. Teniendo en cuenta: a) las observaciones arriba expresadas; b) que los métodos para purificación y concentración de antígeno pueden variar ampliamente entre los laboratorios de América del Sur que fabrican las vacunas; c) que, bajo condiciones de campo se espera alta inmunidad poblacional en áreas con programas avanzados de erradicación; y d) que la inducción de anticuerpos luego de la inmunización puede estar afectada por la edad del animal, por 'boosters' provocados por infecciones anteriores, y por los ciclos de vacunación, los antígenos 3D/VIAA deben usarse con reserva, por lo menos, cuando se requieren ensayos muy sensibles.

Se ha logrado gran progreso al conseguir distinguir inequívocamente, en el campo, animales infectados de los no infectados, independientemente de su estado de vacunación, mediante el uso de antígenos virales no capsídicos obtenidos por ingeniería genética, adicionales al 3D, en un ensayo de EITB (4), o en pruebas de ELISA (7). A pesar de su alta sensibilidad, estas pruebas eliminaron un número grande de resultados VIAA/3D-IDGA-positivos debidos a vacunación y revacunación. Esta máxima sensibilidad puede mantenerse, considerando que el análisis simultáneo de varios antígenos permite mantener también una alta especificidad. Debido a la alta sensibilidad y especificidad, estos

ensayos permiten la confirmación de ausencia de actividad viral según recomendación de la Oficina Internacional de Epizootias, para el reconocimiento internacional de región libre de FA. La aplicación de herramientas tan sensibles es también pertinente durante los procesos de erradicación previos a la suspensión de la vacunación y también como un dato adicional en el análisis de riesgo para la selección de animales destinados a importación/exportación.

A pesar de que para este último propósito, la prueba de IDGA no posee la sensibilidad suficiente, aún así es una herramienta útil en muchos laboratorios, como un dato adicional en los estudios que se realizan periódicamente para determinar la prevalencia e incidencia de anticuerpos contra VIAA/3D en la población animal susceptible a la enfermedad, así como para establecer si un rebaño ha tenido o no contacto reciente con el virus de la FA. Para estos casos el uso de un antígeno recombinante garantiza la inocuidad, y en relación al IDGA-VIAA tradicional ofrece un método más consistente, con especificidad comparable, y por lo menos la misma sensibilidad.

REFERENCIAS

1. Alonso A, Sondahl MS. Preparación y concentración de los antígenos 140 S, 12 S y VIA del virus de la fiebre aftosa. Bol Cent Panamerican Fiebre Aftosa 1975; (17-18): 1-6.
2. Alonso Fernández A, Gomes I, Bahnemann H. The induction of antibodies against VIAA in cattle vaccinated and revaccinated with inactivated foot-and-mouth disease vaccine. Bol Cent Panamerican Fiebre Aftosa 1988; (54): 43-50.
3. Alonso Fernández A, Gomes MPD, Martins MA, Sondahl MS. Detection of foot-and-mouth disease

- virus infection associated antigen antibodies: comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay and agar gel immunodiffusion test. *Prev Vet Med* 1990; 9: 233-240.
4. Bergmann IE, 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 non-structural viral antigens. *Am J Vet Res* 1993; 6:825-841.
 5. Cowan KM, Graves JG. A third antigenic component associated with FMD infection. *Virology* 1966; 30: 528-540.
 6. Mackay DKJ, Madekurozwa RL. Assessment of the VIAA ELISA for FMD. Report for the Community Reference Laboratory for FMD. Pirbright: Institute for Animal Health; 1992.
 7. Mackay DKJ, Forsyth M, Davies PR, Berlinzani A, Belsham GJ, Flint M, Ryan MD. Differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease using a panel of recombinant non-structural proteins in ELISA. *Vaccine* 1994; 16:446-459.
 8. McVicar JW, Sutmoller P. Foot-and-mouth disease: the agar gel diffusion precipitin test for antibody to virus infection-associated (VIA) antigen as a tool for epizootiologic surveys. *Am J Epidemiol* 1970; 92:273-278.
 9. Morgan DO, Moore DM, McKercher PD. Purification of foot-and-mouth disease virus infection-associated antigen. In: Proceedings Eighty-Second Annual Meeting of the United States Animal Health Association; 1978 Oct 29-31, Nov 1-3, Buffalo, New York. Richmond, Virginia: USAHA; 1978. pp. 277-283.
 10. Neitzert E, Beck E, Augé de Mello P, Gomes I, Bergmann IE. Expression of the aphthovirus RNA polymerase gene in *E. coli* and its use together with other bioengineered non-structural antigens in detection of late persistent infections. *Virology* 1991;184:799-804.
 11. Newman JFE, Piatti PG, Gorman BM, Burrage TG, Ryan MD, Flint M, Brown F. Foot-and-mouth disease virus particles contain replicase protein 3D. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:733-737.
 12. O'Donnell VK, Boyle DB, Sproat K, Fondevila AF, Schudel AA, Smitsaart EN. Detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus using a liquid-phase blocking sandwich ELISA (LPBE) with a bioengineered 3D protein. *J Vet Diagn Invest* 1996; 8: 143-150.
 13. Polatnik J, Arlinghaus RA. Foot-and-mouth disease virus-induced RNA polymerase in baby hamster cells. *Virology* 1967; 31: 601-608
 14. Rowlands DJ, Cartwright B, Brown F. Evidence for an internal antigen in foot-and-mouth disease virus. *J Gen Virol* 1969; 4:479-487.
-

Short Report

**USE OF A RECOMBINANT
FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS 3D POLYMERASE IN AN
AGAROSE GEL IMMUNODIFFUSION TEST**

Bergmann Ingrid E.¹, Malirat Viviana¹, Falczuk Abraham², Sondahl Magnus S.¹

¹Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS)

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

²Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA)

Av. Fleming 1653, Martínez, Buenos Aires, Argentina

In the present study, examination was made of the effectiveness of a complete recombinant 3D polypeptide in an AGID test (AGID-3D), for use in the detection of FMDV-infection-specific antibodies, regardless of vaccination condition. Results indicate that compared with the traditional AGID VIAA, the AGID 3D offers, particularly when assessing low titer sera, a more consistent method, with comparable specificity, and at least equal sensitivity. Neither of the antigens offered any particular advantage with regard to band differentiation. Replacement of the VIAA by a recombinant 3D antigen has considerable attractions, since it provides an unlimited supply of a safe, inexpensive, easily purified and consistent material, eliminating the potential presence of non-specific BHK or capsidial antigens.

The term “virus infection associated antigen” (VIAA) of foot-and-mouth disease virus (FMDV) conventionally refers to a complex of non-structural proteins identified by Cowan and Graves (5), the major component of which is the viral RNA polymerase, 3D (13).

The first reported technique for detecting antibodies against VIAA as an aid to indicate previous FMDV infection was the agar gel immunodiffusion test (AGID) (8). Due to the low sensitivity of this assay, Alonso collaborators (3), developed a liquid-phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA-VIAA) to identify and quantify antibodies against FMDV-VIAA. However, the improved sensitivity attained by applying this kind of assay, when compared with the AGID-VIAA,

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

increased the number of VIAA-positive results in cattle vaccinated and reimmunized with vaccines containing high concentrations of non-purified FMDV antigens. Moreover, limited reproducibility of the VIAA tests(6) (I. Bergmann personal communication) appears to be an inherent property of the semi-purified nature of the VIAA preparations, which are subjected to variation in antigen quality among different batches. Furthermore, for production of conventional antigen, the FMDV-VIAA is partially purified from virus suspensions produced in baby hamster kidney (BHK) cells, which requires a high-security laboratory unit for handling FMDV (1,9).

To overcome the mentioned limitations, the replacement of the VIAA by a recombinant FMDV polymerase (3D) antigen has considerable attractions, since it provides an unlimited supply of a safe, inexpensive, easily purified and consistent material. Moreover this approach eliminates the potential presence of non-specific antigens, like BHK or capsidial antigen components in the VIAA preparations, which may be recognized in the AGID-VIAA test by sera from cattle inoculated with BHK-produced vaccines, leading to false-positive results. In the present study, examination was made of the effectiveness of a complete recombinant 3D polypeptide, constructed and purified as described previously (10), in an AGID test (AGID-3D), for use in detection of FMDV-infection-specific antibodies, regardless of vaccination condition.

A comparative study of the use of the traditional VIAA and the recombinant 3D polypeptide in an AGID test indicated that neither of the antigens offered any particular advantage with regard to band differentiation.

No difference in the positions, intensity, rate of formation and visibility of the precipitation bands was observed.

High specificity of the AGID-3D test was indicated by negative results for 250 sera from cattle in aphthovirus-free areas. Thus, high specificity of the AGID-VIAA was maintained when using the recombinant antigen.

AGID-3D-positive results were obtained when sera from 60 cattle involved in field outbreaks, bled 20-40 days after detection of the disease, were assessed. Therefore, no difference with the overall sensitivity of the AGID-VIAA test could be established. Titration of the reactive sera in the AGID-3D gave values 1-3 times higher than those obtained in the AGID-VIAA, depending on the VIAA preparation. Follow-up of sequentially collected sera from 4 persistently infected cattle indicated that irrespective of the 3D batch, AGID-3D detected antibodies indicative of viral replication for up to about 280 days after infection. Such stage of the infection could be detected with only one of the four VIAA preparations studied. These findings clearly indicate the increased consistency of the AGID results obtained with the recombinant 3D antigen when compared to those yielded by the traditional VIAA preparation, particularly when assessing low-titer sera.

Further studies were conducted to determine whether the AGID-3D could eliminate positive results yielded by AGID-VIAA for post-vaccination sera (2). To this effect, the reactivity of sera with an unexpectedly high number of AGID-VIAA-positive results was examined. Samples from systematically vaccinated cattle in regions with no FMD for at least the past 3 years, yet

showing AGID-VIAA-positive results in 61% (147/240) of the sera obtained from cattle > 2 years old, and in 11% (22/207) of those collected from the < 2 years old cattle, born after the last FMD outbreak, were studied. Of the AGID-VIAA-positive sera in the population over and under than 2 years of age, 91% and 41%, respectively, also reacted with the recombinant 3D. Overall positivity was reduced to 55% and 4% in the > and < 2 years old cattle, respectively. Similarly, reactivity of sera with unusually high number of AGID-VIAA-positive results (78 of 90 cattle) obtained 30 days after a single dose of vaccine had been administered 120 days after initial vaccination was assessed. Vaccine antigens were obtained in roller flasks, and in contrast to standard production procedures, these antigens were not clarified; also, they were concentrated fourfold. Of the 78 VIAA-positive sera, 7 became negative in the AGID-3D. Also analyzed were experimental sera from two groups of 20 cattle, each vaccinated and revaccinated twice at 60-day intervals, with vaccines prepared with antigens produced in suspension cell cultures and concentrated to 18 and 54 µg/5ml dose were also analyzed. Most of the cattle, which were AGID-VIAA-positive between 15 and 30 days after revaccination, were also reactive by AGID-3D.

These data clearly indicated that a number of AGID-VIAA-false-positive results in post-vaccinated sera were eliminated by AGID-3D. In most cases, however, such reactivities were maintained and likely represented anti-3D antibodies elicited against the RNA polymerase present in the vaccine preparations. In fact, early findings by Rowlands and collaborators (14) showed that antiserum produced in guinea pigs that had received highly purified inactivated

virus particles reacted with VIA antigen isolated from virus. More recent evidence by electron microscopy indicated that the 3D protein is a component of at least 20-30% of the virus particles (11). Failure to detect reactivity against 3D in many vaccinated animals may be related to insufficient concentration of the 3D polypeptide in the viral suspensions, as well as to the relatively low sensitivity of the AGID test. In this context, the same recombinant 3D applied in immunoenzymatic tests (10), clearly showed that antibodies against 3D are present in sera from many vaccinated cattle. Such reactivities become particularly evident after revaccination. O'Donnell and collaborators (12), using another bacterially expressed 3D recombinant protein established anti-3D antibody-positive results transiently in sera from cattle immunized with vaccines from one out of the two producers tested. Taking into account: a) the observations mentioned above; b) that methods for antigen purification and concentration used to manufacture vaccines in laboratories in South America may vary widely; c) that under field conditions high immunological coverage is expected in areas with advanced eradication programs; and d) that stimulation of antibodies upon immunization can be affected by animal age, boosters from previous infections and vaccination cycles, the 3D/VIAA should be used with caution, at least, when highly sensitive assays are required.

Great progress has been made to distinguish unequivocally in a field setting infected from non-infected animals, regardless of their vaccination condition, by the use of additional bioengineered non-capsideal viral antigens, other than 3D, in an EITB assay (4), or

ELISA tests (7). In spite of the high sensitivity, the tests eliminated a large number of VIAA/3D-AGID-positive results due to vaccination and revaccination. Maximum sensitivity could be maintained under the assumption that the simultaneous assessment of many antigens will resolve the consequent loss of specificity. Because of the high sensitivity and specificity, these assays allow confirmation of the absence of FMDV activity as required by the Office International des Epizooties for international recognition as being FMD-free. The application of such sensitive tools is also relevant during the eradication process prior to suspension of vaccination and as an input in risk analysis for import/export testing.

Although for the latter purposes, the AGID test lacks sufficient sensitivity, it is still a useful tool in many laboratories, as an aid in periodical surveys to determine the prevalence and incidence of antibodies against VIAA/3D in the animal population susceptible to the disease, and to establish whether a herd has or has not had recent contact with the FMD virus. For such cases the use of a recombinant antigen guarantees biosafety, and compared with the traditional AGID VIAA, offers a more consistent method, with comparable specificity, and at least equal sensitivity.

REFERENCES

1. Alonso Fernández A, Sondahl MS. Preparación y concentración de los antígenos 140 S, 12 S y VIA del virus de la fiebre aftosa. Bol Cent Panamericano Fiebre Aftosa 1975; (17-18): 1-6.
2. Alonso Fernández A, Gomes I, Bahnemann H. The induction of antibodies against VIAA in cattle vaccinated and revaccinated with inactivated foot-and-mouth disease vaccine. Bol Cent Panamericano Fiebre Aftosa 1988; (54): 43-50.
3. Alonso Fernández A, Gomes MPD, Martins MA, Sondahl MS. Detection of foot-and-mouth disease virus infection associated antigen antibodies comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay and agar gel immunodiffusion test. Prev Vet Med 1990; 9: 233-240.
4. Bergmann IE, 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 non-structural viral antigens. Am J Vet Res 1993; 6: 825-841.
5. Cowan KM, Graves JG. A third antigenic component associated with FMD infection. Virology 1966; 30: 528-540.
6. Mackay DKJ, Madekurozwa RL. Assessment of the VIAA ELISA for FMD. Report for the Community Reference Laboratory for FMD. Pirbright: Institute for Animal Health; 1992.
7. Mackay DKJ, Forsyth M, Davies PR, Berlinzani A, Belsham GJ, Flint M, Ryan MD. Differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease using a panel of recombinant non-structural proteins in ELISA. Vaccine 1994; 16: 446-459.
8. McVicar JW, Sutmoller P. Foot-and-mouth disease: the agar gel diffusion precipitin test for antibody to virus infection-associated (VIA) antigen as a tool for epizootiologic surveys. Am J Epidemiol 1970; 92: 273-278.
9. Morgan DO, Moore DM, McKercher PD. Purification of foot-and-mouth disease virus infection-associated antigen. In: Proceedings Eighty-Second Annual Meeting of the United States Animal Health Association; 1978 Oct 29-31, Nov 1-3, Buffalo, New York. Richmond, Virginia: USAHA; 1978. pp. 277-283.
10. Neitzert E, Beck E, Augé de Mello P, Gomes I, Bergmann IE. Expression of the aphthovirus RNA polymerase gene in *E. coli* and its use together with other bioengineered non-structural antigens in detection of late persistent infections. Virology 1991; 184: 799-804.

11. Newman JFE, Piatti PG, Gorman BM, Burrage TG, Ryan MD, Flint M, Brown F. Foot-and-mouth disease virus particles contain replicase protein 3D. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:733-737.
 12. O'Donnell VK, Boyle DB, Sproat K, Fondevila AF, Schudel AA, Smitsaart EN. Detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus using a liquid-phase blocking sandwich ELISA (LPBE) with a bioengineered 3D protein. J Vet Diagn Invest 1996; 8: 143-150.
 13. Polatnik J, Arlinghaus RA. Foot-and-mouth disease virus-induced RNA polymerase in baby hamster cells. Virology 1967;31: 601-608
 14. Rowlands DJ, Cartwright B, Brown F. Evidence for an internal antigen in foot-and-mouth disease virus. J. Gen Virol 1969; 4:479-487.
-

RESUMO

Uso de uma proteína recombinante do vírus da febre aftosa, a polimerasa 3D, em uma prova de imunodifusão em gel de agar.

Neste estudo, se examinou a efetividade do uso do polipeptídico 3D recombinante, obtido em sua forma nativa numa prova de IDGA (IDGA-3D), para uso na detecção de anticorpos específicos de infecção com VFA, independentemente da condição de vacinação. Os resultados indicam que em relação à prova tradicional de IDGA-VIAA, a IDGA 3D oferece,

particularmente quando se avaliam soros de baixo título, um método mais consistente, com especificidade comparável e pelo menos a mesma sensibilidade. Nenhum dos抗ígenos ofereceu uma vantagem particular com respeito à definição das bandas de precipitação. A substituição do VIAA pela proteína 3D recombinante tem consideráveis atrações, dado que proporciona um fornecimento ilimitado de material inócuo, econômico, de fácil purificação e consistente, eliminando a presença potencial de抗ígenos não específicos de células BHK ou componentes do capsídeo do VFA.