

centro panamericano de fiebre aftosa

ISSN 0101-6970

Serie de Manuales Técnicos

Nº 6

**IDENTIFICACION DE ANTICUERPOS VIA  
DE LA FIEBRE AFTOSA**

**IDENTIFICATION OF FOOT-AND-MOUTH DISEASE  
VIA ANTIBODIES**



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

**IDENTIFICACION DE ANTICUERPOS VIA  
DE LA FIEBRE AFTOSA**

---

**IDENTIFICATION OF FOOT-AND-MOUTH DISEASE  
VIA ANTIBODIES**

*A. Alonso Fernandez<sup>1</sup>, M.S. Söndahl<sup>1</sup>  
Homero Giacometti<sup>1</sup>, Maria Elma V. Ferreira<sup>1</sup>*

CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA (OPS/OMS)  
Caixa Postal 589, 20000, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

1984

---

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

## CONTENIDO

	Pág.
Identificación de anticuerpos VIA de la fiebre aftosa en sueros de animales: producción de reactivos, realización de pruebas e interpretación de resultados . . . . .	7
– Introducción . . . . .	9
– Materiales y Métodos. . . . .	10
Preparación del antígeno VIA . . . . .	10
Inactivación de la suspensión que contiene el antígeno VIA . . . . .	11
Suero control . . . . .	11
Preparación del agar al 2% . . . . .	12
Tampón glicina . . . . .	12
Preparación de placas . . . . .	12
Titulación de los reactivos . . . . .	12
Determinación de anticuerpos anti-VIA en sueros de animales . . . . .	13
Cuantificación de anticuerpos VIA por titulación en IDGA . . . . .	14
– Resultados. . . . .	14
Titulación del antígeno VIA y suero control . . . . .	14
Análisis de sueros para identificar anticuerpos VIA . . . . .	14
Titulación de sueros . . . . .	15
– Comentarios . . . . .	18
– Referencias . . . . .	31

## CONTENTS

	Page
Identification of foot-and-mouth disease VIA antibodies in animal sera: production of reagents, performance of tests and interpretation of results. .	19
— Introduction . . . . .	21
— Materials and Methods. . . . .	22
Preparation of the VIA antigen . . . . .	22
Inactivation of the suspension containing the VIA antigen. . . . .	23
Control serum . . . . .	23
Preparation of the 2% agar . . . . .	24
Glycine buffer. . . . .	24
Preparation of plates . . . . .	24
Titration of the reagents . . . . .	24
Determination of anti-VIA antibodies in animal sera . . . . .	25
Quantification of VIA antibodies by IDAG titration. . . . .	25
— Results . . . . .	26
Titration of the VIA antigen and the control serum . . . . .	26
Analysis of sera to identify VIA antibodies. . . . .	26
Titration of sera . . . . .	26
— Remarks . . . . .	30
— References. . . . .	31

---

IDENTIFICACION DE ANTICUERPOS VIA DE LA  
FIEBRE AFTOSA EN SUEROS DE ANIMALES:  
PRODUCCION DE REACTIVOS, REALIZACION DE  
PRUEBAS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

---

## INTRODUCCION

Un antígeno asociado a la infección viral (VIA) fue identificado en suspensiones de virus de la fiebre aftosa (4). Dicho antígeno parecería ser una forma inactiva de la polimerasa del ácido ribonucleico (ARN) viral (8). Anticuerpos para el antígeno VIA fueron detectados por inmunodifusión en gel de agar (IDGA) en sueros de bovinos que habían enfermado de fiebre aftosa (6) o habían sido inoculados con virus vivo atenuado o con vacunas inactivadas con formol (1). Sin embargo, sueros de animales primovacunados con vacunas inactivadas con un inactivante de primer orden no tenían anticuerpos anti-VIA detectables por IDGA (1, 6). No obstante, cuando estos animales fueron inoculados con virus de la fiebre aftosa, muchos de ellos desarrollaron anticuerpos VIA sin presentar signos de la enfermedad (1). Trabajos recientes (5, 7) han demostrado que la aplicación repetida de vacunas inactivadas induce en bovinos la aparición de anticuerpos anti-VIA, si bien son de baja intensidad y corta duración.

El antígeno y los anticuerpos VIA se caracterizan por ser específicos de fiebre aftosa, pero no de tipo de virus (4), por lo que la identificación de estos anticuerpos sirve para detectar infecciones, pero no el tipo de virus actuante.

De lo expuesto anteriormente se deduce que la identificación de anticuerpos anti-VIA por pruebas de IDGA proporciona una valiosa ayuda en el estudio de la prevalencia del virus de la fiebre aftosa en las poblaciones animales susceptibles a la enfermedad y en la selección de rebaños libres de fiebre aftosa en áreas endémicas, los cuales podrían proporcionar animales para ser usados en pruebas inmunológicas o para la exportación. Una correcta interpretación de los resultados obtenidos en las pruebas

de IDGA, unido a un adecuado muestreo de la población a ser examinada, permite conocer si un rebaño estuvo o no en contacto con el virus de la fiebre aftosa en fecha reciente. En caso de duda pueden hacerse pruebas para aislar virus del líquido esofágico-faríngeo (LEF) (9).

En este manual técnico se describe la metodología utilizada por el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (CPFA) para la producción de antígeno VIA, y la cuantificación de los reactivos VIA. Además, se explica el procedimiento seguido para analizar sueros por IDGA y la interpretación de los resultados.

## MATERIALES Y METODOS

### *Preparación del antígeno VIA*

Células BHK<sub>21</sub>, Clon 13, de suspensión, cultivadas en frascos rolantes durante 48-72 horas con 100 ml de Eagle modificado sin suero, son inoculadas con 10<sup>5</sup> dosis infectante 50% (DI<sub>50</sub>) de virus, y a seguir son colocadas en estufa a 37°C. Cuando la monocamada presenta marcado efecto citopático y comienza a desprenderse, lo que ocurre aproximadamente a las 18 horas después de la inoculación, a cada frasco se añaden 5 ml de cloroformo, se agitan nuevamente, se congelan a -20°C, se descongelan y se clarifica por centrifugación a 1000 g durante 10 minutos.

A la suspensión virulenta clarificada se le agrega 0,05% (p/v) de DEAE-Sephadex A<sub>50</sub> (0,5 g por litro de suspensión) y se mantiene en agitación suave a 4°C durante 48 horas. Después de este tiempo es recogido el Sephadex, pasando la mezcla por una jeringa de 50 ml, en la que en el fondo fue colocada una capa de lana de vidrio y encima una tela metálica tupida.

Una vez preparada la columna de Sephadex, se lava con tampón A (0,15M ClNa y 0,02M Tris, con pH 7,6) hasta

que sea eluido el rojo fenol del Sephadex. A continuación, se hace pasar muy lentamente tampón B (1M ClNa y 0,02M Tris, con pH 7,6) en una proporción aproximada de 150 ml por gramo de Sephadex. Este tampón que eluye el VIA es recogido en fracciones de 30 a 50 ml, a las que se añade una solución saturada de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> hasta que aparezca turbidez debida a la precipitación de las proteínas.

El precipitado es recogido por centrifugación a 8000 g durante 20 minutos a 4°C y resuspendido en tampón A en la proporción de 5 ml por 1000 ml de suspensión virulenta. Posteriormente es clarificado por centrifugación a 3000 g durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante contiene el antígeno VIA.

### *Inactivación de la suspensión que contiene el antígeno VIA*

El antígeno VIA así obtenido puede contener virus activo. Para tornarlo inocuo es inactivado con 0,05M de etilenimina binaria (BEI) (2) a 30°C durante 12 horas. Transcurrido ese tiempo, se realiza la prueba de inocuidad, inoculando un frasco rolante con células BHK<sub>21</sub>, Clon 13, con 1 ml de antígeno VIA y realizando dos pasajes consecutivos a las 48 horas de haber realizado la inoculación. El antígeno VIA es considerado libre de virus activo cuando en ningún pasaje la monocamada de células presenta efecto citopático, ni es detectado virus por fijación del complemento. A la suspensión de antígeno VIA inactivada se le añade 0,02% de ázida sódica y se conserva a 4°C.

### *Suero control*

El suero control es una mezcla de sueros hiperinmunes O, A y C obtenidos en cobayos infectados e hiperinmunizados a las 6 semanas de la infección, dos veces con 0,2 ml de virus vivo, a intervalo de una semana. Una semana después de la última hiperinmunización los animales son

sangrados y el suero es inactivado a 56°C durante 30 minutos. La prueba de inocuidad del suero control es realizada igual a como se ha indicado para el antígeno VIA.

#### *Preparación del agar al 2%*

Se disuelven 20 gramos de agar noble (Difco) con 1.100 ml de agua desmineralizada y se esteriliza a 15 libras de presión durante 10 minutos. Luego se vierte en una bandeja, se deja solidificar y se corta en cubos de aproximadamente 2 cm de lado, los cuales se colocan en agua corriente durante 24 horas. Posteriormente, se lavan tres veces más con agua desmineralizada y se mantienen en ella a 4°C hasta su uso.

#### *Tampón glicina*

Se compone de 1M de glicina, 0,057M de dietilbarbiturato de sodio y 1% de ázida sódica a un pH de 7,8 ajustado con una solución 1N de HCl.

#### *Preparación de placas*

El agar al 2%, después de fundido por ebullición, es mezclado en partes iguales con el tampón glicina. A continuación, 16 ml de la mezcla de agar al 1% son vertidos en placas de Petri de plástico de 90 mm de diámetro, las cuales se colocan en una superficie nivelada y se mantienen a temperatura entre 20 y 30°C. Una vez gelificado, el agar es perforado con un molde de siete perforadores, dispuestos: uno en el centro y seis en la periferia de 4 mm de diámetro externo cada uno, guardando simetría y mediando 2 mm entre ellos y el perforador central. El agar de las cavidades es extraído por succión leve. En cada placa se hacen cuatro moldes.

#### *Titulación de los reactivos*

Antes de ser usado, cada lote de antígeno VIA o suero

control es titulado en IDGA (Figura 1). Para tal fin, el antígeno es diluido 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32 en tampón glicina y es colocado en las 6 cavidades periféricas de los 4 moldes de una placa de Petri. El suero control es diluido 1:1, 1:2, 1:4 y 1:8 también en tampón glicina y distribuido en las cavidades centrales. Cada una de las cavidades debe llenarse hasta el borde con la dilución correspondiente. Una buena distribución de los reactivos se consigue con pipetas Pasteur y perillas de goma.

Las placas se mantienen en medio ambiente y en superficie nivelada. Cuando el lugar de trabajo es seco, es aconsejable utilizar un ambiente humidificado. La titulación es leída entre 1 y 3 días después de realizada. La dilución óptima de uso de cada reactivo es la última que proporciona una reacción nítida.

#### *Determinación de anticuerpos anti-VIA en sueros de animales*

Se usan placas de Petri preparadas como las empleadas en la titulación de los reactivos. De esa manera, en cada placa se pueden analizar 16 sueros (ver Figura 2).

El antígeno VIA en la dilución adecuada es colocado en las cavidades centrales. El suero control, también en la dilución preestablecida, es colocado en dos cavidades opuestas en la periferia de cada molde. Los sueros a ser examinados son distribuidos en las cuatro cavidades restantes.

Los demás detalles de la técnica son los mismos indicados en la titulación de los reactivos.

Las reacciones son observadas entre 1 y 3 días. La prueba sólo será considerada válida cuando los controles proporcionen nítidas bandas de precipitación.

Los sueros analizados en la Figura 2 muestran una reacción que es interpretada según indicado en el Cuadro 1.

### Cuantificación de anticuerpos VIA por titulación en IDGA

La distribución del antígeno VIA y del suero control y la lectura son iguales a como se ha descrito anteriormente. Los sueros que en la prueba anterior proporcionaron una reacción intensa (semejante a la del suero control) pueden ser titulados en IDGA. Para tal fin, las diluciones 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16 son distribuidas en las cuatro cavidades que, en cada molde, corresponden a los sueros desconocidos. Por tanto, en una placa pueden titularse cuatro sueros.

El título del suero expresa la última dilución que proporciona una reacción positiva.

## RESULTADOS

### Titulación del antígeno VIA y el suero control

La Figura 1 muestra las reacciones obtenidas al titular un antígeno VIA y un suero control VIA positivo. En esta prueba se comprueba que hay una reacción nítida del antígeno y del suero hasta en las diluciones del 1:16 y 1:4 respectivamente. Sin embargo, las diluciones de uso son de 1:6 para el antígeno, 1:2 para el suero, las cuales garantizan buenas reacciones.

### Análisis de sueros para identificar anticuerpos VIA

En la Figura 2 se indican los resultados obtenidos al analizar por IDGA 16 sueros bovinos y en el Cuadro 1 se anota la interpretación de las reacciones de los sueros examinados en la Fig. 2. En ocasiones, algunos sueros presentan reacciones de no identidad, es decir, líneas de precipitación que cruzan la banda del suero positivo (Fig. 2, suero N° 4), lo que indica que dicha reacción no es debida a anticuerpos anti-VIA. Los sueros que no dan reacciones de identidad son considerados negativos. Las reacciones de no identidad han sido observadas en sueros VIA positivos y negativos.

### Titulación de sueros

La Figura 3 muestra el esquema para titular algunos sueros que en la Fig. 2 (sueros N° 5, 6, 12 y 14) presentaron una intensa reacción positiva. El título de los mismos es 1:4, 1:8, 1:16 y 1:8 respectivamente.

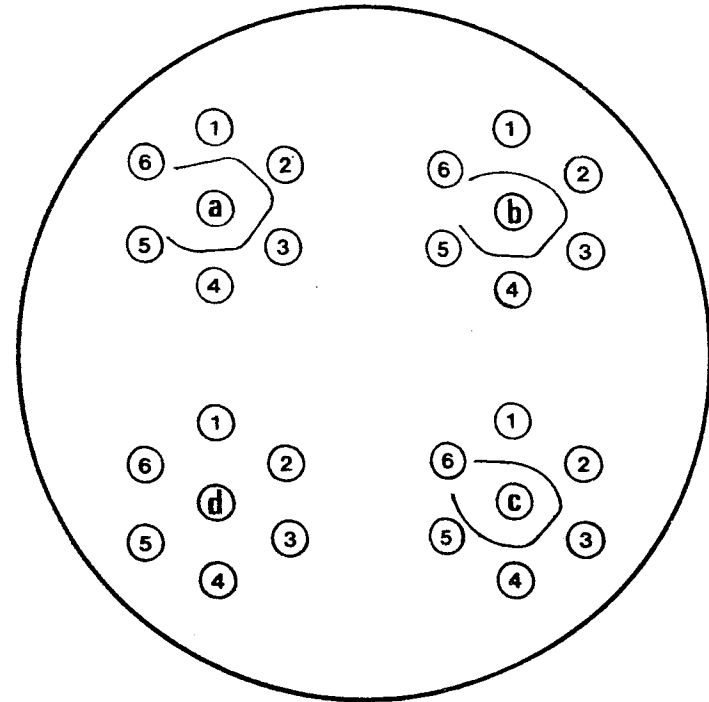


FIGURA 1. Titulación de antígeno VIA y suero control

- 1, 2, 3, 4, 5 y 6 = Diluciones de antígeno 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32 respectivamente.  
a, b, c y d = Diluciones de suero 1:1, 1:2, 1:4 y 1:8 respectivamente.



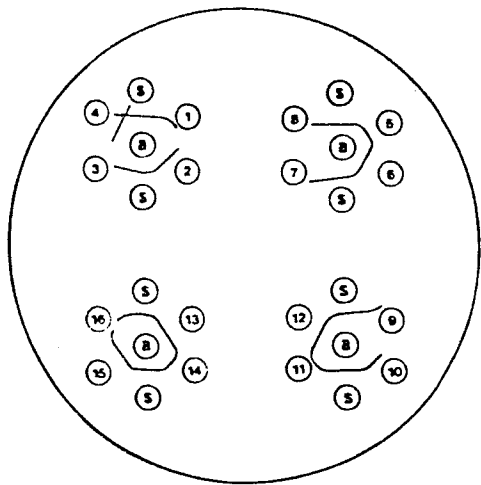


FIGURA 2. Examen de sueros de bovinos para identificar anticuerpos anti-VIA por la técnica de inmunodifusión en gel de agar

a = Antígeno VIA en la dilución 1:6 titulado en la Figura 1.  
 s = Suero control (VIA positivo) en la dilución 1:4, titulado en la Figura 1.  
 1 a 16 = Sueros de bovinos en análisis.

CUADRO 1. Interpretación de la reacción proporcionada por los sueros de bovinos examinados en la Figura 2

Sueros No	Intensidad reacción	Sueros No	Intensidad reacción
1	+	9	-
2	++	10	+
3	-	11	+
4	-	12	++
5	++	13	++
6	++	14	++
7	-	15	++
8	-	16	+

- = Negativo. + = Positivo. ++ = Positivo intenso.

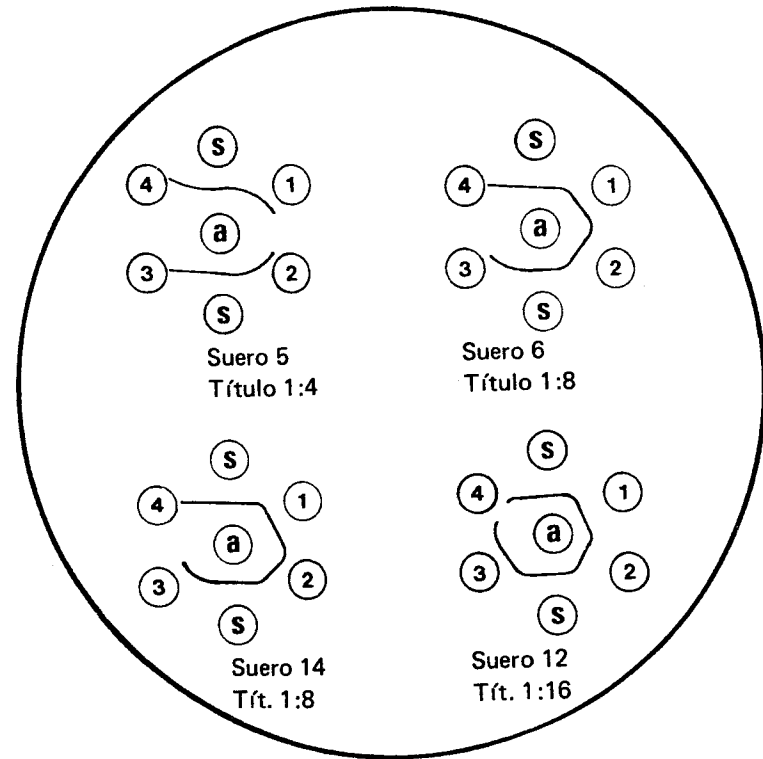


FIGURA 3. Cuantificación de anticuerpos anti-VIA por titulación de sueros con reacciones intensas

a = Antígeno VIA.  
 s = Suero control (VIA positivo).  
 1, 2, 3 y 4 = Diluciones 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16 de cada suero respectivo.

## COMENTARIOS

El proceso de preparación y titulación del antígeno VIA y del suero control VIA positivo indicado anteriormente ha sido ampliamente probado en el CPFA y en la mayoría de los países de América del Sur.

En la IDGA, la sensibilidad y reproductibilidad de la prueba depende del uso de los reactivos en diluciones óptimas, por lo que su correcta titulación es de suma importancia.

La cuantificación de la intensidad de la reacción de los sueros en la prueba de rutina, junto con un adecuado muestreo de la población a examinar, escalonándola por grupos de edad es de suma utilidad para caracterizar correctamente las diferentes situaciones epidemiológicas específicas debidas a la naturaleza de la experiencia pasada que el animal haya tenido con el virus en las regiones afectadas por la fiebre aftosa.

Conviene hacer la sangría de los animales tres o más meses después de la vacunación.

La aplicación e interpretación a nivel de campo de los anticuerpos anti-VIA están ampliamente tratados en la Monografía Científica N° 6 preparada por el CPFA (3).

---

IDENTIFICATION OF FOOT-AND-MOUTH DISEASE  
VIA ANTIBODIES IN ANIMAL SERA:  
PRODUCTION OF REAGENTS, PERFORMANCE OF  
TESTS AND INTERPRETATION OF RESULTS

---

## INTRODUCTION

A virus-infection-associated (VIA) antigen was identified in foot-and-mouth disease (FMD) virus suspensions (4). The antigen appeared to be an inactive form of the ribonucleic acid (RNA) viral polymerase (8). Antibodies to the VIA antigen were detected by the immune diffusion agar gel (IDAG) test of sera from cattle that had been affected by FMD (6) or had been inoculated with either attenuated live viruses or formalin-inactivated vaccines (1). However, sera from animals first vaccinated with vaccines inactivated with inactivants of a first-order kinetics showed no anti-VIA antibodies detectable by IDAG (1, 6). However, when these animals were inoculated with FMD virus, many of them developed VIA antibodies without showing signs of the disease (1). Recent studies (5, 7) have demonstrated that repeated application of inactivated vaccines induce in cattle the appearance of anti-VIA antibodies, albeit of low intensity and short duration.

The VIA antibodies and antigen are characteristically FMD specific, but not virus type specific (4). Identification of these antibodies therefore serves to detect infection, but does not specify the type of active virus.

From the foregoing, it is deduced that identification of anti-VIA antibodies by means of IDAG tests provides a valuable aid in the study of the prevalence of the FMD virus in the animal populations susceptible to the disease and in the selection of FMD-free herds in endemic areas, which herds could provide animals for use in immunological testing or for exportation. Correct interpretation of the results obtained in the IDAG tests, in conjunction with an adequate sampling of the population to be examined, enables to ascertain whether a herd

has or has not had recent contact with the FMD virus. In case of doubt, tests can be undertaken to isolate virus from the oesophageal-pharyngeal (OP) fluid (9).

This technical report describes the methodology utilized by the Pan American Foot-and-Mouth Disease Center (PAFMDC) for the production of VIA antigen and for the quantification of the VIA reagents. The procedure followed for sera analysis by means of IDAG and the interpretation of the results are also explained.

## MATERIALS AND METHODS

### *Preparation of the VIA antigen*

BHK<sub>21</sub>, Clon 13 cell suspensions, cultivated in roller bottles for 48-72 hours with 100 ml of modified Eagle medium not supplemented with serum, are inoculated with 10<sup>5</sup> infective dose 50% (ID<sub>50</sub>) of virus and kept at 37°C. When the monolayer shows a marked cytopathic effect and the cells begin to detach—this occurs approximately 18 hours post inoculation—5 ml of chloroform are added to each bottle. Then the bottles are again shaken, cooled to -20°C, thawed out, and clarified by centrifugation at 1000 g for 10 minutes.

0.05% (w/v) of DEAE-Sephadex A<sub>50</sub> (0.5 g per liter of suspension) is then added to the clarified virulent suspensions. The suspension is then stirred lightly at 4°C for 48 hours, after which the Sephadex is collected by straining the mixture through a 50 ml syringe having a glass wool in the bottom kept in place by a fine metal screen.

Once the Sephadex column is prepared, it is washed with buffer A (0.15M NaCl and 0.02M Tris at pH 7.6) until the phenol red is eluted from the Sephadex. Then a very slow passage of buffer B (1M NaCl and 0.02M Tris at

pH 7.6) is made, at approximately 150 ml per gram of Sephadex. This buffer, which elutes the VIA, is collected in 30 to 50 ml fractions to which is added a saturated (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution until turbidity is produced by the precipitation of the proteins.

The precipitate is removed by centrifugation at 8000 g for 20 minutes at 4°C and resuspended in buffer A at the proportion of 5 ml per 1000 ml of virulent virus suspension. Later is clarified by centrifugation at 3000 g for 20 minutes at 4°C. The supernatant contains the VIA antigen.

### *Inactivation of the suspension containing the VIA antigen*

The VIA antigen obtained by means of the aforementioned procedure may contain active virus. It is rendered innocuous through inactivation with 0.05M of binary ethyleneimine (BEI) (2) at 30°C for 12 hours. The innocuity of the inactivated virus suspension is tested by inoculating a roller bottle containing Clon 13 BHK<sub>21</sub> cells with 1 ml of VIA antigen and conducting two consecutive passages at 48 hours post inoculation. The VIA antigen is considered free of active virus when neither passage discloses a cytopathic effect in the cell monolayer, nor is virus detected by the complement fixation test. Then 0.02% of sodium azide is added to the inactivated VIA antigen and it is stored at 4°C.

### *Control serum*

The control serum is a mixture of hyperimmune O, A and C sera obtained from guinea pigs infected and hyper-immunized at 6 weeks post infection with 0.2 ml of live virus administered twice with a one-week interval. Blood samples are taken from the animals one week after the second hyperimmunization and the serum is inactivated for 30 minutes at 56°C. The control serum innocuity test

is conducted in the same manner as indicated for the VIA antigen.

#### *Preparation of the 2% agar*

20 grams of noble agar (Difco) are dissolved in 1100 ml of demineralized water and sterilized for 10 minutes at 15 lbs pressure. The solution is then poured into a tray and left to solidify. It is then cut into approximately 2-cm cubes that are placed in a running waterbath for 24 hours. Later the cubes are washed three times again with demineralized water and kept in the water at 4°C until utilized.

#### *Glycine buffer*

The buffer is composed of 1M glycine, 0.057M sodium diethylbarbiturate, and 1% sodium azide having a pH of 7.8 adjusted with a 1N solution of HCl.

#### *Preparation of plates*

The 2% agar is melted and then mixed with equal parts of the glycine buffer. Then 16 ml of the 1% agar mixture are poured into plastic Petri plates measuring 90 mm in diameter. The plates are placed on a levelled surface and the temperature is kept between 20 and 30°C. After the agar has jelled, wells are made by means of a seven-punch mold. In the center of the mold there is a well punch, around which are symmetrically arranged six punches, each measuring 4-mm in external diameter and 2-mm between them. Four sets of wells are made on each plate. Light suction is used to remove the agar cut from the wells.

#### *Titration of the reagents*

Prior to use each batch of VIA antigen or control serum is titered in IDAG (Figure 1). For this purpose the antigen is diluted 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 and 1:32 in

glycine buffer and is placed in the six outlying wells of the 4 molds on a Petri plate. The control serum is also diluted 1:1, 1:2, 1:4 and 1:8 in glycine buffer and distributed in the central wells. Each of the cavities should be filled to the brim with the corresponding dilution. A good distribution of the reagents can be obtained by means of Pasteur pipettes and rubber bulbs.

The plates are kept at room temperature on a levelled surface. If the work area is dry, a humidified environment is recommended. The titration reading is taken after 1 to 3 days. The optimum dilution for using each reagent is the highest one that yields a clear reaction.

#### *Determination of anti-VIA antibodies in animal sera*

Petri plates are prepared and used as in the titration of the reagents. 16 sera can then be analyzed on each plate (see Figure 2).

The VIA antigen in the suitable dilution is put in the central wells. The control serum, likewise in the pre-established dilution, is placed in two opposite wells on the edge of each mold. The sera to be tested are distributed in the four remaining wells.

The remaining details of the technique are as indicated in the titration of the reagents.

The reactions are observed between 1 and 3 days. The test will be regarded as valid only when the controls yield clear precipitation bands.

The sera analyzed in Figure 2 show a reaction that is interpreted as indicated in Table 1.

#### *Quantification of VIA antibodies by IDAG titration*

The preparation of the plates, the distribution of the VIA antigen and of the control sera, and the reading, are as described above. The sera that in the previous test have

yielded an intense reaction (similar to that of the control serum) can be titered in IDAG. In this regard, the 1:2, 1:4, 1:8 and 1:16 dilutions are distributed in the four cavities intended for the unknown sera on each mold. Four sera can therefore be titered on a single plate.

The titer of the serum is the highest dilution that yields a positive reaction.

## RESULTS

### *Titration of the VIA antigen and the control serum*

Figure 1 shows the reactions obtained from titration of a VIA antigen and a positive VIA control serum. This test produces a clear reaction of the antigen and the serum up to the 1:16 and 1:4 dilutions, respectively. Nevertheless, the dilutions that are used in routine tests to ensure good reactions are 1:6 for the antigen and 1:2 for the serum.

### *Analysis of sera to identify VIA antibodies*

Figure 2 indicates the results obtained from IDAG analysis of 16 cattle sera. Table 1 shows the interpretation of the reactions of the sera examined in Figure 2. In some instances, some sera yield non-identity reactions; that is, precipitation lines cross the positive serum band (Figure 2, serum No. 4); this indicates that such a reaction is not due to antibodies against VIA. The sera that do not yield identity reactions are regarded as negative. Non-identity reactions have been observed in positive and negative VIA sera.

### *Titration of sera*

Figure 3 shows the scheme for titration of several sera that yielded an intense positive reaction in Figure 2 (sera 5, 6, 12 and 14). Their titers are, respectively, 1:4, 1:8, 1:16 and 1:8.

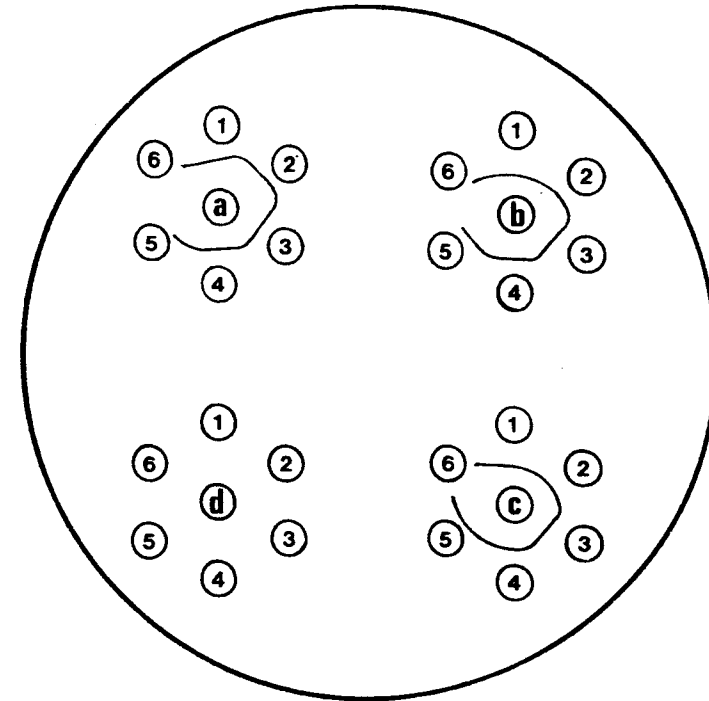


FIGURE 1. *Titration of VIA antigen and control serum*

- 1, 2, 3, 4, 5 & 6 = Antigen dilutions 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 and 1:32, respectively.  
a, b, c & d = Serum dilutions 1:1, 1:2, 1:4 and 1:8, respectively.

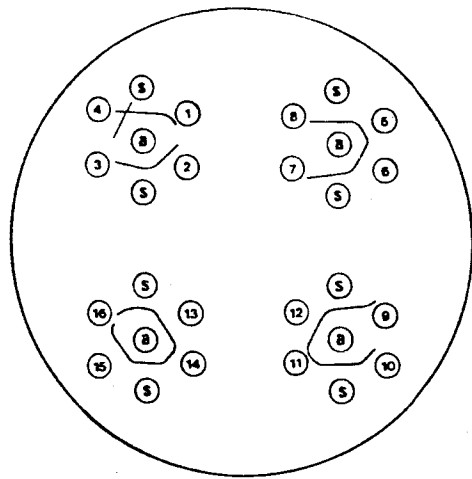


FIGURE 2. Analysis of cattle sera to identify anti-VIA antibodies by the immune diffusion agar gel test

- a = VIA antigen in 1:6 dilution titered in Figure 1.  
 s = Control serum (VIA positive) in 1:4 dilution titered in Figure 1.  
 1 to 16 = Cattle sera under analysis.

TABLE 1. Interpretation of the reaction provided by the cattle sera examined in Figure 2

Sera No.	Reaction intensity	Sera No.	Reaction intensity
1	+	9	-
2	++	10	+
3	-	11	+
4	-	12	++
5	++	13	++
6	++	14	++
7	-	15	++
8	-	16	+

- = Negative. + = Positive. ++ = Intense Positive.

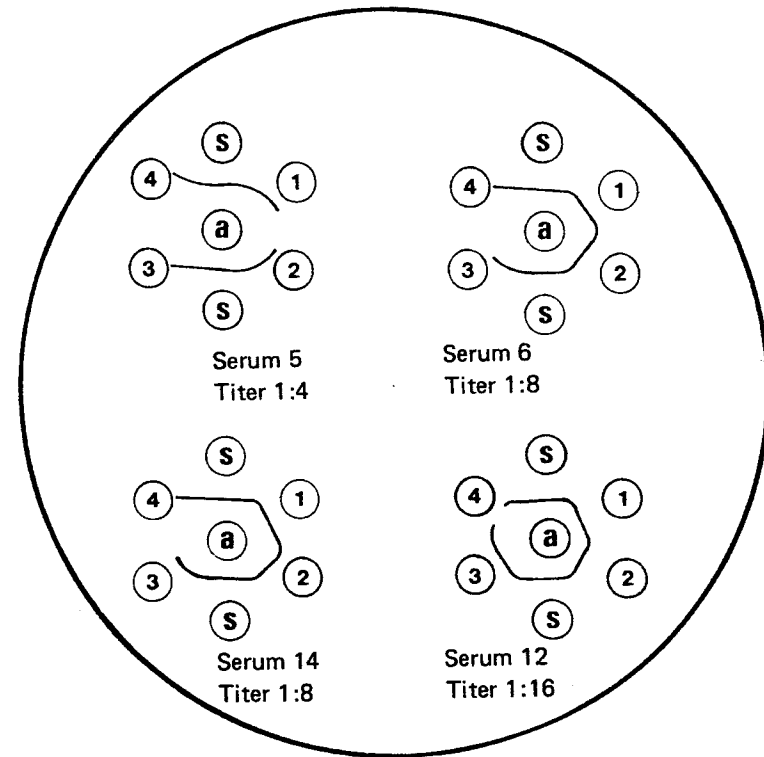


FIGURE 3. Quantification of anti-VIA antibodies by titration of sera having intense reactions

- a = VIA antigen.  
 s = Control serum (VIA positive).  
 1, 2, 3, 4 = Dilutions 1:2, 1:4, 1:8 and 1:16 of each respective serum.

## REMARKS

The foregoing process utilized to prepare and titer the VIA antigen and the positive VIA control serum has been extensively tested at PAFMDC and in most of the South American countries.

In the IDAG test, the sensitivity and reproducibility of the test is dependent on the use of the reagents at optimal dilutions. Correct titration is therefore of utmost importance.

Quantification of the intensity of the sera's reactions in the routine test, together with an adequate sampling of the population to be examined by dividing it into age groups, is of great utility in attaining the correct characterization of the different epidemiological situations due to the nature of the past experience which the animal has had with the FMD virus.

It is recommended that blood samples be taken from the animals three or more months post vaccination.

The application and interpretation of the anti-VIA antibodies in the field is fully discussed in Scientific Monograph No. 6 issued by the PAFMDC (3).

## REFERENCIAS – 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. BAHNEMANN, H.G. Binary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production. *Arch. Virol.* 47 (1): 47-56, 1975.
3. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA. El uso de las pruebas del antígeno asociado con la infección por virus (VIA) de la fiebre aftosa. *Ser. Monog. Cient. Técn.* 6, 1980.
4. COWAN, K.M. & GRAVES, J.H. A third antigenic component associated with foot-and-mouth disease infection. *Virology* 30 (3): 528-540, 1966.
5. DAWÉ, P.S. & PINTO, A.A. Antibody responses to type-specific and virus-infection-associated antigens in cattle vaccinated with inactivated polyvalent foot-and-mouth disease virus in North Malawi. *Br. vet. J.* 134: 504-511, 1978.
6. McVICAR, J. & SUTMÖLLER, P. Foot-and-mouth disease: the agar gel diffusion precipitation test for antibody virus-infection-associated (VIA) antigen as a tool for epizootiologic surveys. *Am. J. Epid.* 92 (4): 273-278, 1970.
7. PINTO, A.A. & GARLAND, A.J.M. Immune response to virus-infection-associated (VIA) antigens in cattle repeatedly vaccinated with foot-and-mouth disease virus inactivated by formalin or acetyleneimine. *J. Hyg. (Camb.)* 82 (1): 41-50, 1979.
8. POLATNICK, J., ARLINGHANS, R., GRAVES, J.H., COWAN, K.M. Inhibition of cell-free foot-and-mouth disease virus ribonucleic acid synthetics by antibody. *Virology* 31: 609-615, 1967.
9. SUTMÖLLER, P. & COTTRAL, G.E. Improved techniques for the detection of foot-and-mouth disease virus in carrier cattle. *Arch. ges. Virusforsch.* 21 (2): 170-177, 1967.