

## Resúmenes

### Abstracts

**BARANOWSKI E, SEVILLA N, VERDAGUER N, RUIZ JARABO CM, BECK E, DOMINGO E.**

Journal of Virology 1998; 72 (8): 6362-6372. Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM), Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid.

#### **Determinantes múltiples de virulencia del virus de la fiebre aftosa en cultivo celular.**

Variantes hipervirulentos del virus de la fiebre aftosa (VFA) del serotipo C se presentan mediante infecciones seriadas citolíticas o persistentes en cultivo celular. Una mutación específica en el sitio interno del ribosoma de entrada del virus resistente de FA fue previamente relacionada con un incremento en la actividad de iniciación de translación la cual podría contribuir al fenotipo hipervirulento por las células BHK-21. Diversos variantes hipervirulentos del virus de la fiebre aftosa crecidos de los pasajes seriados citolíticos no presentan variabilidad del sitio de la entrada interna del ribosoma mas tienen un número de mutaciones que afectan las proteínas virales estructurales y no estructurales. La construcción de los tipos quiméricos de los transcriptos infecciosos O-tipo C ha permitido el mapeamiento de un determinante mayor de hipervirulencia en la cápside viral. El VFA adaptado a cultivo de tejidos demostró afinidad reforzada por heparina, sin embargo el acoplamiento en la superficie celular de radicales de sulfato de heparina no fue requerido para la expresión del fenotipo hipervirulento en células de ovario de ratón

#### **Multiple virulence determinants of foot-and-mouth disease virus in cell culture.**

Hypervirulent variants of foot-and-mouth disease virus (FMDV) of serotype C arise upon serial cytolytic or persistent infections in cell culture. A specific mutation in the internal ribosome entry site of persistent FMDV was previously associated with enhanced translation initiation activity that could contribute to the hypervirulent phenotype for BHK-21 cells. Several hypervirulent FMDV variants arising from serial cytolytic passages show an invariant internal ribosome entry site but have a number of mutations affecting structural and nonstructural viral proteins. The construction of chimeric type O-type C infectious transcripts has allowed the mapping of a major determinant of hypervirulence to the viral capsid. Tissue culture-adapted FMDV showed enhanced affinity for heparin, but binding to cell surface heparin sulfate moieties was not required for expression of the hypervirulent phenotype in Chinese hamster ovary (CHO) cells. Virulence was identical or higher for glycosaminoglycan-deficient CHO cells than for wild-type CHO cells. FMDV variants with decreased affinity for heparin were selected

chino (OCH). La virulencia se mostró idéntica o mayor para células OCH con deficiencia en glicosaminoglican. Variantes del VFA con afinidad disminuida a la heparina fueron seleccionadas de una población paternal de alto ligamiento. Las substituciones asociadas a la disminución de acoplamiento de heparina fueron localizadas en posición 173 de la proteína capsidal VP3 y 144 de la proteína capsidal VP1. Estas substituciones tuvieron un efecto moderado en la virulencia por las células BHK-21 pero anularon completamente la infección de las células OCH. Los resultados comparativos con diversos aislamientos del virus de la fiebre aftosa muestran que i) la afinidad aumentada por heparina y las alteraciones en el tropismo celular pueden estar controlados por un número de sitios independientes en la cápside viral ii) las mismas modificaciones capsidales pueden tener diferentes efectos en diferentes tipos de células.

from a high-binding parental population. Substitutions associated with decreased heparin binding were located at positions 173 of capsid protein VP3 and 144 of capsid protein VP1. These substitutions had a moderate effect on virulence for BHK-21 cells but completely abrogated infection of CHO cells. The comparative results with several FMDV isolates show that (i) increased affinity for heparin and alterations in cell tropism may be mediated by a number of independent sites on the viral capsid and (ii) the same capsid modifications may have different effects on different cell types.

#### **CAMERON AR, BALDOCK FC.**

Preventive Veterinary Medicine 1998; 34 (1): 1-17. Lao-Australian Animal Health Project, PO Box 7042, Vientiane, Laos.

#### **Una nueva fórmula de probabilidad de los estudios para la erradicación substancial de la enfermedad.**

Este manuscrito presenta una nueva fórmula que calcula la exacta probabilidad para la detección de los animales enfermos, y considera ambas pruebas imperfectas y el tamaño de la población finito. Esta fórmula es computacionalmente inconveniente, por consiguiente, una aproximación que es más simples de calcular también es presentada. El uso de estas fórmulas para cálculo del tamaño de la muestra y análisis de los resultados del estudio es discutida. Un programa de

#### **A new probability formula for surveys to substantiate freedom from disease.**

This paper presents a new formula that calculates the exact probability of detecting diseased animals, and considers both imperfect tests and finite population size. This formula is computationally inconvenient, therefore an approximation that is simpler to calculate is also presented. The use of these formulae for sample-size calculation and analysis of survey results is discussed. A computer program, FreeCalc, implementing the formulae is presented along with examples of sample size

computador, de cálculo automático, implementando las fórmulas es presentado juntamente con ejemplos de cálculo del tamaño de las muestras para dos diferentes escenarios. Se sugiere que estas fórmulas y programa de computador capacitan el cálculo preciso de los requisitos de estudio de tamaño de las muestras y el análisis correcto de los resultados del estudio. Como resultado, los costos del estudio pueden ser minimizados y los resultados de ello deben fornecer con confiabilidad el nivel requerido de prueba de ausencia de la enfermedad.

#### **CLERCQ K.**

Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties 1998; 17 (3): 786-795. Veterinary and Agrochemical Research Centre, Groeselenberg 99, 1180 Ukkel, Belgium.

#### **Implementación de una garantía de calidad en los laboratorios nacionales de fiebre aftosa, basada en las directrices del Organismo Internacional de Epizootias.**

El acto final del Round Uruguayo del Acuerdo General en Impuestos y Comercio, 1994, contiene el Acuerdo en la Aplicación de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias, que visa reducir los efectos negativos de las barreras en salud en el mercado internacional a un mínimo. Por consiguiente, el Organismo Internacional de Epizootias (OIE) Comisión Regional para la Europa ha propuesto que un sistema de acreditación basado en el standard EN 45000 debe ser aplicado para alcanzar el reconocimiento internacional de los certificados y pruebas laboratoriales. A fin de alcanzar esa meta, la Comisión de Standards de la OIE publicó una serie de directrices para la evaluación de la calidad laboratorial y de las pruebas de proficiencia. En 1995, la Organización de la Alimentación y Agricultura (FAO), Comisión Europea para el

calculation for two different scenarios. It is suggested that these formulae and computer program enable the accurate calculation of survey sample-size requirements, and the precise analysis of survey results. As a result, survey costs can be minimized and survey results should reliably provide the required level of proof of freedom from disease.

#### **Implementation of quality assurance in national foot-and-mouth disease laboratories, based on the guidelines of the Office International des Epizooties.**

The final act of the Uruguay Round of the General Agreement on Tariffs and Trade, 1994, contains the Agreement on the Application of Sanitary and Phytosanitary Measures, which aims to reduce the negative effects of health barriers on international trade to a minimum. Therefore, the Office International des Epizooties (OIE) Regional Commission for Europe proposed that an accreditation system based on the EN 45000 standard should be applied to achieve international recognition of certificates and testing laboratories. To this end, the OIE Standards Commission published a series of guidelines for the evaluation of laboratory quality and proficiency testing. In 1995, the Food and Agriculture Organization, European Commission for the Control of Foot-and-

Control de la Fiebre Aftosa, recomendó que la propuesta de la OIE debería ser aplicada en todos los laboratorios de diagnóstico de la fiebre aftosa (FA) en Europa. Esta revisión resume el standard EN 45001 y las directrices de la OIE, y propone que estas directrices deban tomarse como una base para la implementación de un programa de seguridad de calidad en los laboratorios de la FA.

Mouth Disease recommended that the OIE proposal should be applied in all foot and mouth disease (FMD) diagnostic laboratories in Europe. This review summarizes the EN 45001 standard and the OIE guidelines, and proposes that these guidelines should be taken as a basis for the implementation of a quality assurance programme in FMD laboratories.

### **COX SJ, BARNETT PV, DANI P, SALT JS.**

Vaccine 1999; 17 (15-16): 1858-1868. Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory, Ash Road, Pirbright, Woking, Surrey GU24 0NF, UK.

#### **Vacunación de emergencia en ovejas contra la fiebre aftosa: protección contra la enfermedad y reducción de la transmisión por contacto.**

La habilidad de diversas formulaciones de vacuna de emergencia contra la fiebre aftosa para despertar inmunidad protectora temprana en ovejas, fue examinada usando 52 ovejas Polled Dorset con edad entre 6-12 meses. Todas las formulaciones de vacuna protegieron las ovejas contra el desafío en aerosol con el virus homólogo de la fiebre aftosa (VFA) con 4 días de vacunación. La protección fue asociada en parte con la inducción de la respuesta de anticuerpos en suero y también fue demostrada por la ausencia de respuesta de cualquier anticuerpo perceptible en el momento del desafío. Las formulaciones de la vacuna *acquosa Saponina/Al(OH)3* y vacunas oleosas de emulsión basadas en el adjuvante Montanide ISA 206 redujeron la replicación del virus y los números de animales subclínicamente infectados en hasta 28 días después del desafío, cuando comparadas con animales no vacunados, consecuentemente limitando la transmisión de la enfermedad o infección a los animales susceptibles por contacto.

#### **Emergency vaccination of sheep against foot-and-mouth disease: protection against disease and reduction in contact transmission.**

The ability of several emergency FMD vaccine formulations to elicit early protective immunity in sheep was examined using 52 Polled Dorset sheep aged 6-12 months. All vaccine formulations protected sheep against airborne challenge with homologous FMDV within 4 days of vaccination. Protection was associated in part with the induction of serum antibody responses but was also demonstrated in the absence of any detectable antibody response at the time of challenge. Aqueous  $Al(OH)_3$ /saponin vaccine formulations and oil emulsion vaccines based on Montanide ISA 206 adjuvant reduced virus replication and the numbers of animals subclinically infected up to 28 days after challenge, when compared with non-vaccinated animals, consequently limiting transmission of the disease or infection to in-contact susceptible animals.

**DUFOUR B.**

Veterinary Research 1999; 30 (1): 27-37. Cneva Direction Generale, 23, avenue du Général de Gaulle, BP 19, 94701 Maisons-Alfort, France.

**Método de evaluación técnico y económico para utilización en el mejoramiento de las redes de vigilancia de la enfermedad infecciosa animal.**

Una herramienta de la evaluación técnica y económica cualitativa y cuantitativa fue desarrollada y aplicada a tres redes de vigilancia epidemiológica: RENESA (Una red de vigilancia francesa para salmonella y contaminación de micoplasma en las unidades de producción de pollería sujetas a los controles sanitariooficiales), la red francesa de vigilancia epidemiológica de la fiebre aftosa y el REPIMAT (La red de vigilancia epidemiológica en el Chad para las enfermedades del ganado mayor). Los puntos críticos en las redes de vigilancia epidemiológica fueron identificados usándose una versión modificada del análisis de riesgo: Método de control del punto crítico (HACCP). Una reja de evaluación fue validada por expertos consultados de acuerdo con el método Delphi. Un cuestionario para coleccionar la información solicitada para la evaluación y una guía de evaluación fue diseñada. El procedimiento de evaluación también incluyó un cálculo de costos operacionales anuales para 2 de las 3 redes. Los resultados detallados de la evaluación técnica y económica fueron usados para sugerencias específicas formuladas a fin de mejorar las redes. El costo de la implementación de estas propuestas fue calculado. Los efectos de la implementación de cada uno de los mejoramientos propuestos fueron simulados y una nueva cuenta de evaluación global fue determinada para cada red. El “valor por punto” de cada mejoramiento fue calculado y discutido.

**Technical and economic evaluation method for use in improving infectious animal disease surveillance networks.**

A qualitative and quantitative technical and economic evaluation tool was developed and applied to 3 epidemiological surveillance networks: RENESA (a French surveillance network for salmonella and mycoplasma contamination in poultry production units subject to official sanitary controls), the French Foot-and-Mouth Disease Epidemiological Vigilance Network and REPIMAT (the epidemiological surveillance network in Chad for major cattle diseases). Critical points in epidemiological surveillance networks were identified using a modified version of the hazard analysis: critical control point (HACCP) method. An evaluation grid was validated by experts consulted in accordance with the Delphi method. A questionnaire to collect the information required for the evaluation and a scoring guide was designed. The evaluation procedure also included a calculation of the annual operating costs for 2 of the 3 networks. The detailed results of the technical and economic evaluation were used to formulate specific suggestions for improving the networks. The cost of implementing these proposals was calculated. The effects of implementing each of the proposed improvements were simulated and a new global evaluation score was determined for each network. The ‘cost per point’ of each improvement was calculated and discussed. This tool for the technical and economic

Esta herramienta para la evaluación técnica y económica de las redes de vigilancia epidemiológica para enfermedades animales es propuesta en la medida que ella puede ser probada en una escala mucho más amplia y eventualmente ser usada en el mejoramiento del funcionamiento de dichas redes y para el análisis de riesgo en el mercado internacional.

evaluation of epidemiological surveillance networks for animal diseases is proposed so that it may be tested on a much wider scale and eventually be used in improving the functioning of such networks and for risk analysis in international trade.

**HUTBER AM, KITCHING RP, CONWAY DA.**

Tropical Animal Health and Production 1998; 30 (4): 217-227. Computing Department, Institute for Animal Health, Pirbright, GU24 0NF, UK.

**Control de la fiebre aftosa por vacunación y el aislamiento de animales infectados.**

Datos colectados de 19 focos de fiebre aftosa (FA) en Arabia Saudita (1988-94) fueron estudiados. En cada hacienda donde ocurrieron los focos, los bovinos eran regularmente vacunados y rebaños enteros también eran revacunados dentro de 1-2 días de diagnóstico inicial. La durabilidad de estas vacunas se extendía por 2.5 meses, proporcionando un nivel de protección del 81-98%. Sin embargo, la vacunación frecuentemente fallaba en prevenir el establecimiento, y algunas veces la persistencia, de la enfermedad. Se sugirió que esto ocurre debido a que la naturaleza altamente contagiosa del VFA crea niveles aumentados de excreción viral durante un foco, y la cohabitación en haciendas de Arabia Saudita de animales susceptibles/afectados conforme el diagnóstico, predispone el rebaño a la re-infección. La excreción pre-clínica del virus

**Control of foot-and-mouth disease through vaccination and the isolation of infected animals.**

Data from 19 foot-and-mouth disease (FMD) outbreaks in Saudi Arabia (1988-94) were studied. On each farm on which the outbreaks occurred, the cattle were regularly vaccinated and entire herds were also re-vaccinated within 1-2 days of initial diagnosis. The durability of these vaccines extended for 2.5 months, providing an 81-98% level of protection. However, vaccination often failed to prevent the establishment, and sometimes persistence, of the disease. It is suggested that this is because the highly contagious nature of FMD creates increasing levels of viral excretion during an outbreak, and the co-habitation in Saudi farms of affected/susceptible animals following diagnosis, predisposes the herds to re-infection. Pre-clinical excretion of the virus leads to the infection of additional in-contact susceptible animals before diagnosis, so the

genera la infección de animales susceptibles por contacto antes del diagnóstico, de modo que el aislamiento de animales clínicamente infectados no garantiza la remoción de la infección. Se sugiere que todos los animales clínicamente infectados deben ser removidos del rebaño luego después del diagnóstico y si es posible, los animales incubados de los mismos/vecinos corrales también deben ser aislados.

isolation of clinically infected animals does not guarantee the removal of infection. It is suggested that all clinically infected animals should be removed from the herd immediately after diagnosis and if possible the incubating animals from the same/surrounding pens should also be isolated.

**LOPEZ INZAURRALDE A, MOREIRA EC.**

Revista Brasileira de Medicina Veterinária 1998; 20 (4): 148-153. Centro Pan-Americano de Febre Aftosa (OPAS/OMS), Caixa Postal 598, 20001-970, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

**Epidemiología de la estomatitis vesicular en Brasil: una revisión.**

El manuscrito recupera la historia epidemiológica de la estomatitis vesicular en Brasil y localiza la distribución geográfica de las viroses causativas. Los autores analizaron 5.200 resultados de pruebas diagnósticas hechas por el Centro Panamericano de la Fiebre Aftosa (OPS/OMS) entre agosto del 1964 y julio del 1996. Los autores concluyen que las viroses del grupo Indiana-2 fueron responsables en Brasil por dos epidemias autolimitadas mas no han estado presente, por lo menos con actividad clínica, por más de 15 años. La situación epidemiológica del virus Alagoas debe ser considerada independiente del subtipo Indiana-2. El virus presenta actividad continua en el campo desde que fue diagnosticado por la primera vez y ha sido detectado en áreas relativamente extensas.

**Vesicular stomatitis epidemiology in Brazil: a review.**

The paper recovers the epidemiological history of vesicular stomatitis in Brazil and locates the geographic distribution of the causative viruses. The authors analyzed 5,200 results of diagnosis tests done by the Pan American Foot-and-Mouth Disease Center (PAHO/WHO) between August 1964 and July 1996. The authors conclude that viruses of the Indiana-2 group were responsible in Brazil for two self-limiting epidemics but have not been present, at least with clinical activity, for more than 15 years. The epidemiological situation of the Alagoas virus must be considered independent from the Indiana-2 subtype. The virus presents continuous activity in the country since it was first diagnosed and has been detected in relatively extensive areas.

**MACKAY DKJ, FORSYTH MA, DAVIES PR, BERLINZANI A, BELSHAM GJ, FLINT M, RYAN MD.**

Vaccine 1998; 16 (5): 446-459. Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory, Ash Road, Pirbright, Woking, Surrey GU24 ONF, UK.

**Diferenciando infección de vacunación contra la fiebre aftosa usando un panel de proteínas recombinantes, proteínas no-estructurales en ELISA.**

Un perfil de ELISA fue desarrollado para detectar anticuerpos contra las proteínas no estructurales (NS) Lb, 2C, 3A, 3D, y a la poliproteína 3ABC, del virus de la fiebre aftosa (VFA). El ensayo fue utilizado para examinar paneles de 30 sueros de bovinos negativos, y de animales experimentalmente infectados o vacunados. Todos los sueros de los bovinos infectados experimentalmente con cualquier de los 7 serotipos del VFA fueron positivos para el anticuerpo a 2C, 3A, 3D y 3ABC, y la mayoría fueron positivos a Lb. Las 3 categorías de sueros podrían ser diferenciadas en base de la presencia o ausencia del anticuerpo a las proteínas estructurales y/o proteínas NS del VFA. El ensayo es simple, rápido y reproducible y puede ser usado para identificar infecciones tempranas en animales que son sueropositivos por anticuerpo a las proteínas estructurales del virus. Cuando se validó el ensayo con suero de campo se demostró que el anticuerpo a 3ABC, y usualmente una o más de las otras proteínas no estructurales, sólo se descubrió en animales reportados por haber presentado signos clínicos de la FA. Los bovinos vacunados que recibieron menos que 5 vacunaciones, eran frecuentemente positivos para anticuerpos contra 3D, pero eran negativos para anticuerpos a 3ABC. Ocasionalmente animales que habían recibido más de 10 vacunaciones tenían perfiles de anticuerpo para proteína NS similares a aquellos vistos después de infección.

**Differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease using a panel of recombinant, non-structural proteins in ELISA.**

A profiling ELISA was developed to detect antibody to the non-structural (NS) proteins Lb, 2C, 3A, 3D, and the polyprotein 3ABC, of foot-and-mouth disease virus (FMDV). The assay was used to examine panels of 30 sera each from naive cattle, and from experimentally infected or vaccinated animals. All sera from cattle experimentally infected with any of the 7 serotypes of FMDV were positive for antibody to 2C, 3A, 3D and 3ABC, and the majority were positive for Lb. The 3 categories of sera could be differentiated on the basis of the presence or absence of antibody to the structural and/or NS proteins of FMDV. The assay is simple, rapid and reproducible and can be used to identify previous infection in animals which are seropositive for antibody to the structural proteins of the virus. Validating the assay with field sera demonstrated that antibody to 3ABC, and usually one or more of the other non-structural proteins, was detected only in animals reported to have shown clinical signs of FMD. Vaccinated cattle which had received less than 5 vaccinations, were frequently positive for antibody to 3D but were negative for antibody to 3ABC. Occasional animals which had received more than 10 vaccinations had NS protein antibody profiles which were similar to those seen following infection.

**MATEU MG, ESCARMIS C, DOMINGO E.**

Virus Research 1998; 53 (1):27-37. Centro de Biología Molecular 'Severo Ochoa' (CSIC-UAM), Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain.

**Análisis mutacional de epítopes discontinuos del virus de la fiebre aftosa usando el precursor del promotor de la cápsula sin procesar.**

El precursor de la cápsula no procesado (P1) del virus de la fiebre aftosa (VFA) ha sido expresado en células de mamífero para estudiar epítopes no continuos envueltos en la neutralización viral. Los reemplazos del aminoácido encontrados en los mutantes de los virus evasores fueron manipulados en el precursor P1 usando mutagenesis dirigida de *plasmido*. En todos los casos los reemplazos abolieron el reconocimiento del P1 no procesado por los anticuerpos monoclonales relevantes, igualmente los efectos de las substituciones correspondientes en neutralización del virus infeccioso de la FA. Cinco residuos capsidales dentro de la misma área antigénica discontinua que nunca se encontró reemplazados en mutantes evasores también fueron manipulados en P1. Ninguna de las substituciones afectó el reconocimiento del anticuerpo, lo que sugiere que estos residuos no estaban directamente envueltos en la interacción con los anticuerpos probados. Los resultados validan la mutagenesis dirigida al foco de construcciones que codifican los precursores capsidales como una aproximación para probar la estructura de los epítopes virales discontinuos que no responden al análisis con péptidos sintéticos.

**Mutational analysis of discontinuous epitopes of foot-and-mouth disease virus using an unprocessed capsid promoter precursor.**

An unprocessed capsid precursor (P1) of foot-and-mouth disease virus (FMDV) has been expressed in mammalian cells to study discontinuous epitopes involved in viral neutralization. Amino acid replacements found in virus-escape mutants were engineered in the P1 precursor by site-directed mutagenesis of the plasmid. In all cases the replacements abolished recognition of unprocessed P1 by the relevant monoclonal antibodies, paralleling the effects of the corresponding substitutions in neutralization of infectious FMDV. Five capsid surface residues within the same discontinuous antigenic area that were never found replaced in escape mutants were also engineered in P1. None of the substitutions affected antibody recognition, suggesting that these residues were not directly involved in the interaction with the antibodies tested. The results validate site-directed mutagenesis of constructs encoding capsid precursors as an approach to probe the structure of viral discontinuous epitopes not amenable to analysis with synthetic peptides.

**MATTION N, SMITSAART E, MAZZA M, HARRISON N, FILIPPI JL, ROBILOLO B, PERIOLO O, TORRE J, BELLINZONI R.**

Veterinaria Argentina 1998; 15 (148): 563-572. Biogénesis S.A., Ruta Panamericana km 38.2, (1619) Garín, Buenos Aires, Argentina.

**Vacuna de emergencia contra la fiebre aftosa: Inducción temprana de inmunidad en especies susceptibles.**

Un total de 108 bovinos, 22 cerdos y 30 caprinos fueron usados para probar 15 diferentes vacunas tetravalentes contra la fiebre aftosa (10 en bovinos, 2 en cerdos y 3 en caprinos). 30 días después de la vacunación, los niveles de anticuerpo eran más altos en aquellas vacunas conteniendo saponina inmunomoduladora. Las vacunas con masa antigénica reducida, mas conteniendo saponina, indujeron títulos más altos de anticuerpo que las vacunas con mayores concentraciones de 140S, pero que no tenían saponina. Ningún efecto contrario a la vacunación fue observado. Se concluye que las vacunas conteniendo saponina podrían ser usadas efectivamente para vacunación de emergencia de bovinos, caprinos y cerdos.

**Emergency foot and mouth disease vaccine: early induction of immunity in susceptible species.**

A total of 108 cattle, 22 pigs and 30 goats were used to test 15 different tetravalent foot and mouth disease vaccines (10 in cattle, 2 in pigs and 3 in goats). At 30 days after vaccination, antibody levels were higher in those vaccines containing the immunomodulator saponin. Vaccines with reduced antigenic mass, but containing saponin, induced higher antibody titres than vaccines with greater concentrations of 140S, but lacking saponin. No adverse effects of vaccination were observed. It is concluded that the saponin-containing vaccines could be used effectively for emergency vaccination of cattle, goats and pigs.

**MURPHY MLP, FORSYTH MA, BELSHAM GJ, SALT JS.**

Virus Research 1999; 62 (1): 67-76. BBSRC Institute for Animal Health, Pirbright, Woking, Surrey GU24 0NF, UK.

**Localización del RNA del virus de la fiebre aftosa por hibridización *in situ* en los tejidos bovinos.**

La hibridización *in situ* fue usada para detectar el RNA del virus de la fiebre aftosa (VFA) dentro de las células de los tejidos removidos de bovinos infectados. Una sonda de RNA de sentido negativo marcada con digoxigenina fue preparada a partir de la región del genoma de la fiebre aftosa que codifica parte del RNA polimerasa RNA dependiente (3D). La eficacia y la especificidad de esta prueba para hibridización *in situ* fue determinada usándose células infectadas con virus en cultura de tejido. Una fuerte mancha citoplásmica sólo fue detectada en las células infectadas por el VFA. Diversas muestras de tejido fueron colectadas de bovinos infectados por el VFA entre 5 y 17 días post-infección. El RNA viral fue detectado por hibridización *in situ* dentro de las células del paladar, tonsila y de la faringe hasta 17 días post-infección. Se concluye que esta técnica es útil para el estudio de localización del virus de la fiebre aftosa en bovinos tanto durante y después de la fase aguda clínica de la enfermedad y puede auxiliar en la identificación de sitios específicos de persistencia del virus.

**Localization of foot-and-mouth disease virus RNA by *in situ* hybridization within bovine tissues.**

*In situ* hybridization was used to detect foot-and-mouth disease virus (FMDV) RNA within the cells of tissues removed from infected cattle. A digoxigenin-labelled anti-sense RNA probe was prepared corresponding to a region of the FMDV genome encoding part of the RNA-dependent RNA polymerase (3D). The efficacy and specificity of this probe for *in situ* hybridization was determined using virus-infected cells in tissue culture. Strong cytoplasmic staining was only detected in FMDV-infected cells. Various tissue samples were collected from FMDV-infected cattle between 5 and 17 days post-infection. Viral RNA was detected by *in situ* hybridization within cells of the soft palate, tonsil and pharynx up to 17 days post-infection. It is concluded that this technique is useful for the study of FMDV localization in cattle both during and after the acute clinical phase of disease and may assist in identifying specific sites of virus persistence.

**NIEDBALSKI W, ADAM KH, MARQUARDT O.**

Journal of Virological Methods 1998; 72 (2): 237-242. Bundesforschungsanstalt fur Viruskrankheiten der Tiere, Paul-Ehrlich-Strasse 28, D-72076 Tubingen, Germany.

**Cuantificación de genomas del virus de la fiebre aftosa en tejido bovino mediante RT-PCR competitivo.**

La sensibilidad de una transcripción reversa asociada a una reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) para detectar genomas del virus de la fiebre aftosa (VFA) fue cuantificada por el uso del RNA transcrito in vitro del cDNA específico del virus de la fiebre aftosa. Previamente, el cDNA había sido alargado para 228 bp. El número mínimo de moléculas molde requeridas para obtener el producto específico RT-PCR fue determinado para ser 104. Eso se alcanzó a través del uso de 1 µg de primer para la síntesis cDNA y aplicando al menos 30 ciclos de PCR. El conocimiento de la sensibilidad del sistema capacitó el examen de las muestras clínicas para el contenido de los genomas del VFA. Las muestras se basaban en epitelio lingual y del podal así como la descarga nasal, removidos 11-14 días luego de la infección de los 14 bovinos. Todos los bovinos demostraron contener genomas del VFA, mas no en cada especie clínica. La diferencia de tamaño de los productos ampliados del genoma transcrito y viral permitió la estimación por RT-PCR competitivo del número de genomas virales existentes en algunas muestras. El RNA extraído de aproximadamente 107 tejidos de células de cada epitelio lingual y podal poseían entre <106 y 108 genomas del VFA.

**Quantification of foot-and-mouth disease virus genomes in bovine tissue by competitive RT-PCR.**

The sensitivity of a reverse transcription-dependent polymerase chain reaction (RT-PCR) for detecting foot-and-mouth disease virus (FMDV) genomes was quantified by use of RNA transcribed in vitro from FMDV-specific cDNA. Previously, the cDNA had been elongated by 228 bp. The minimum number of template molecules required to obtain the specific RT-PCR product was determined to be 104. This was achieved by use of 1 µg of primer for cDNA synthesis and by undertaking of at least 30 cycles of PCR. Knowing the sensitivity of the system prompted the examination of clinical samples for content of FMDV genomes. The samples were tongue and foot epithelia as well as nasal discharge, removed 11-14 days after infection from 14 cattle. All cattle were shown to carry FMDV genomes, but not in each clinical specimen. The size difference of the products amplified from transcript and viral genome enabled the estimate by competitive RT-PCR of the number of viral genomes contained in some samples. The RNA extracted from approximately 107 tissue cells each of tongue and foot epithelia contained between <106 and 108 FMDV genomes.

**REID SM, FORSYTH MA, HUTCHINGS GH, FERRIS NP.**

Journal of Virological Methods 1998; 70 (2): 213-217. Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory, Pirbright, Woking, Surrey GU24 0NF, UK.

**Comparación de la transcripción invertida de la reacción en cadena de polimerasa, ELISA y aislamiento viral para el diagnóstico de rutina de la fiebre aftosa.**

Un método de transcripción invertida de la reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR) fue comparada con aislamiento del virus en cultivo celular y el ELISA de antígeno detector para el diagnóstico primario de la fiebre aftosa (FA) en 166 muestras clínicas de campo de bovinos, ovejas, cerdos y caprinos. 80 muestras fueron positivas por aislamiento viral/ELISA y 78 por RT-PCR. El RT-PCR detectó RNA viral de la FA en 11 de las 86 muestras consideradas negativas por el aislamiento viral/ELISA mas fallaron en diagnosticar 13 muestras identificadas como positivas por los últimos procedimientos. Este RT-PCR no es un serotipo específico de modo que un producto cDNA es indicativo de la presencia de RNA viral de la FA. La confirmación de la especificidad del producto cDNA y la identificación del serotipo requiere el análisis de la secuencia del nucleótido. Se concluye que el valor del RT-PCR es que ello puede facilitar rapidamente el análisis molecular de aislados de campo y así proveer información epidemiológica importante con respecto a la fuente de focos. Sin embargo, esa es una técnica sofisticada que requiere equipo especializado, pericia y reactivos refinados y tiene que ser usada en conjunto con procedimientos corrientes para el diagnóstico de la FA.

**Comparison of reverse transcription polymerase chain reaction, enzyme linked immunosorbent assay and virus isolation for the routine diagnosis of foot-and-mouth disease.**

A reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) method was compared with virus isolation in cell culture and the antigen detection ELISA for the primary diagnosis of foot-and-mouth disease (FMD) on 166 clinical field samples from cattle, sheep, pigs and goats. 80 samples were positive by virus isolation/ELISA and 78 by RT-PCR. The RT-PCR detected FMD viral RNA in 11 of the 86 samples assessed as negative by virus isolation/ELISA but conversely failed to diagnose 13 samples identified as positive by the latter procedures. This RT-PCR is not serotype-specific so a cDNA product is indicative of the presence of FMD viral RNA only. Confirmation of the specificity of the cDNA product and the identification of the serotype requires nucleotide sequence analysis. It is concluded that the value of the RT-PCR is that it can rapidly facilitate the molecular analysis of field isolates and thus provide important epidemiological information regarding the source of outbreaks. However, it is a sophisticated technique requiring specialized equipment, expertise and refined reagents and has to be used in conjunction with current procedures for FMD diagnosis.

**REID SM, HUTCHINGS GH, FERRIS NP, CLERCQ K.**

Journal of Virological Methods 1999; 83 (1-2): 113-123. Institute for Animal Health, Pirbright, Woking, Surrey, GU24 0NF, UK.

**Diagnóstico de la fiebre aftosa por RT-PCR: Evaluación de iniciadores para caracterización serotípica de RNA viral en muestras clínicas.**

Los iniciadores múltiples diseñados a partir de regiones 1D y 2AB del genoma viral de la fiebre aftosa (FA) fueron evaluados extensivamente para la detección de todos los 7 serotipos del virus por transcripción invertida de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Los primers habían sido caracterizados previamente en otro lugar en un número relativamente pequeño de aislados crecidos en cultivo celular y suspensiones epiteliales, mostrándose capaces de identificar y diferenciar todos los 7 serotipos del virus de la FA. El estudio evaluó diversos protocolos de RT-PCR en suspensiones epiteliales y fluidos sobrenadantes, resultantes de sus pasajes en cultivo celular, derivadas de muestras clínicas de diversas características moleculares. Cada uno de los primers de serotipo específico en protocolos RT-PCR seleccionados, demostraron especificidad apropiada y detectó aislamientos pasados en cultivo celular con algún éxito mas no fueron adecuados para la serotipificación de suspensiones preparadas de muestras clínicas de epitelio. Se concluye que los primers pueden ser usados en procedimientos de RT-PCR en conjunto con los métodos detectores de rutina de aislamiento viral y ELISA para el diagnóstico e serotipificación del virus de la fiebre aftosa.

**Diagnosis of foot-and-mouth disease by RT-PCR: evaluation of primers for serotypic characterization of viral RNA in clinical samples.**

Multiple primers designed from the 1D and 2AB regions of the foot-and-mouth disease (FMD) viral genome were evaluated extensively for the detection of all 7 serotypes of the virus by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The primers had been characterized previously elsewhere on a relatively small number of cell culture grown isolates and epithelial suspensions and had been shown to identify and differentiate all 7 serotypes of FMD virus. The extended study evaluated several RT-PCR protocols on epithelial suspensions and supernatant fluids, resulting from their passage in cell culture, derived from clinical samples of diverse molecular characteristics. Each of the serotype-specific primers in selected RT-PCR protocols demonstrated suitable specificity and detected cell culture passaged isolates with some success but were not adequate for the serotyping of suspensions prepared from clinical samples of epithelium. It is concluded that the primers can be used in RT-PCR procedures in conjunction with the routine detection methods of virus isolation and ELISA for the diagnosis and serotyping of FMD virus.

**SADIR AM, ZAMORANO PI, ROMERA A, WIGDOROVITZ A, SMITSAART E, MARANGUNICH L, SCHIAPPACASSI C, BORCA MV.**

Veterinary Immunology and Immunopathology 1999; 69 (1): 11-22. Instituto de Virología, CICV, INTA-Castelar, CC77 Morón, (1708) Pcia, Buenos Aires, Argentina.

**Mejora de la respuesta a inmunidad por la vacuna contra el virus de la fiebre aftosa en becerros mediante el uso de Avidine como adyuvante.**

36 becerros, con edad entre 8-10 meses, fueron vacunados s.c. con una vacuna tetravalente contra el virus de la fiebre aftosa (VFA), con o sin Avidina inmunomoduladora (Avr) como adyuvante. La respuesta del anticuerpo anti-VFA fue evaluada usando un bloqueador ELISA sandwich de fase líquida mientras que la respuesta celular fue detectada usando una prueba de antígeno linfoproliferativa específica. Mientras que ninguna diferencia fue detectada en la respuesta celular, la reacción al anticuerpo anti-VFA fue significativamente mayor en animales inmunizados con la vacuna conteniendo Avr. 90 días después de la vacunación, 89-100% de los animales inmunizados con la vacuna con adyuvante Avr presentaron protección pronosticada mayor que 82%, pero sólo 50-61% de los animales inmunizados con vacuna sin inmunomodulador presentaron aquella característica. El aumento del título de anticuerpo del anti-VFA en animales inmunizados con la vacuna conteniendo Avr fue mediado por un aumento en los niveles de ambos IgG1 e IgG2, el cual presentó una correlación significativa con los títulos de anticuerpos ELISA. Se concluye que la adición de Avr a la vacuna de FA mejora el estado inmune de los becerros.

**Improvement of the immune response to foot-and-mouth disease virus vaccine in calves by using Avidine as adjuvant.**

36 calves, aged 8-10 months, were vaccinated s.c. with a tetravalent foot-and-mouth disease virus (FMDV) vaccine, with or without the immunomodulator Avidine (Avr) as adjuvant. The anti-FMDV antibody response was evaluated using a liquid-phase blocking sandwich ELISA while the cellular response was detected using an antigen specific lymphoproliferative test. While no differences were detected in the cellular response, the anti-FMDV antibody reaction was significantly higher in animals immunized with the vaccine containing Avr. At 90 days after vaccination, 89-100% of the animals immunized with the Avr-adjuvanted vaccine presented predicted protection higher than 82%, while just 50-61% of the animals immunized with vaccine without immunomodulator presented that characteristic. The increase in anti-FMDV antibody titre in animals immunized with the vaccine containing Avr was mediated by an increase in the levels of both IgG1 and IgG2, which presented a significant correlation with ELISA antibodies titres. It is concluded that the addition of Avr to the FMDV vaccine improves the immune status of the calves.

**SALT JS, BARNETT PV, DANI P, WILLIAMS L.**

Vaccine 1998; 16 (7): 746-754. Institute for Animal Health, Pirbright. Laboratory, Ash Road, Pirbright, Woking, Surrey GU24 0NF, UK.

**Vacunación de emergencia en cerdos contra la fiebre aftosa: protección contra la enfermedad y reducción de la transmisión por contacto.**

La habilidad protectora de dos nuevas vacunas contra la FA basadas en óleo, preparadas de un tipo de antígeno concentrado aftovirus C1 Oberbayern en cerdos fue examinada. Ambas formulaciones de vacunas demostraron proteger los cerdos contra el desafío por aerosol con el virus homólogo de la fiebre aftosa dentro de 4 días de vacunación, pero no 2 ó 3 días después de la vacunación. La protección fue asociada con la inducción de baja respuesta del título de anticuerpos. Un estudio de transmisión mostró que la inmunización protectora resultó en excreción viral reducida. La vacunación en 7 días, mas no en 4 días, antes del desafío de la prevenida transmisión por contacto de la FA. Las dos formulaciones probadas en el estudio tuvieron una característica favorable de baja viscosidad, baja reactividad y alta potencia, ideal para uso en campañas de vacunación estratégicas para controlar focos de la fiebre aftosa.

**Emergency vaccination of pigs against foot-and-mouth disease: protection against disease and reduction in contact transmission.**

The protective ability of two novel oil-based FMD vaccines prepared from a type C1 Oberbayern aphthovirus antigen concentrate in pigs was examined. Both vaccine formulations were shown to protect pigs against airborne challenge with homologous FMDV within 4 days of vaccination, but not at 2 or 3 days after vaccination. Protection was associated with the induction of variable and low titre serum antibody responses. A transmission study showed that protective immunization resulted in reduced virus excretion. Vaccination at 7 days, but not at 4 days, before challenge prevented contact transmission of FMD. The two formulations tested in the study had the favorable characteristics of low viscosity, low reactivity and high potency, ideal for use in strategic vaccination campaigns to control outbreaks of FMD.

**SAMARTINO LE, FORT MC, TOME JSG, MARDUEL M, PIAZZA E, SALUSTIO E, GREGORET R.**

Revista de Medicina Veterinaria Buenos Aires 1999; 80 (3): 186-189. INTA-CCV y A, Inst. de Patobiología-Area Bacteriología, C.C. N° 77, (CP 1708) Morón, Bs. As., Argentina.

**Evaluación de protección contra la brucelosis proporcionada por cepa 19 en bovinos vacunados simultáneamente con la vacuna contra la fiebre aftosa con adyuvante oleoso.**

137 hembras fueron usadas: 53 vacunadas con cepa de *Brucella abortus* 19, 53 vacunadas simultáneamente con cepa 19 y vacuna contra la fiebre aftosa y 31 no vacunadas contra la brucelosis. Los animales fueron puestos intraconjuntivamente con cepa 2308 de *B. abortus* en el medio de la gestación. Muestras de sangre fueron sacadas periódicamente. No hubo diferencias en el nivel de infección en hembras vacunadas por las 2 técnicas. En los controles, 27 de las 27 vacas gestantes y 2 de las 4 no gestantes fueron infectadas; mientras que en animales vacunados, 55 de las 90 vacas gestantes y 3 de las 16 no gestantes fueron infectadas. Se concluye que la vacunación simultánea con la vacuna contra la FA no afecta la inmunidad conferida por la vacuna contra brucelosis cepa 19.

**Evaluation of the protection against brucellosis provided by strain 19 in cattle vaccinated simultaneously with oil-adjuvanted foot-and-mouth disease vaccine.**

137 females were used: 53 vaccinated with *Brucella abortus* strain 19, 53 vaccinated simultaneously with strain 19 and foot-and-mouth disease vaccine and 31 not vaccinated against brucellosis. The animals were challenged intraconjunctivally with strain 2308 of *B. abortus* half-way through pregnancy. Blood samples were taken periodically. There were no differences in level of infection in females vaccinated by the 2 techniques. In the controls, 27 of 27 pregnant cows and 2 of 4 non-pregnant ones were infected; while in vaccinated animals, 55 of 90 pregnant cows and 3 of 16 non-pregnant ones were infected. It is concluded that simultaneous vaccination with foot-and-mouth disease vaccine does not affect immunity conferred by brucellosis strain 19 vaccine.

**SARAIVA V.**

Revista Brasileira de Medicina Veterinária 1999; 21 (5): 188-191. Centro Pan-americano de Febre Aftosa OPAS/OMS, Caixa Postal 589, CEP 20001-970, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

**Bases metodológicas para la caracterización de riesgo - [Bases metodológicas para a caracterização de risco].**

Metodologías para determinar el riesgo de la enfermedad en ganado son discutidas con respecto al concepto de riesgo; La evaluación cualitativa y cuantitativa, gerencia y comunicación de riesgo; análisis de riesgo, tomando en cuenta la prevalencia de la enfermedad en el campo estudiado, productos animales y exportaciones; y el análisis de riesgo como un medio de prevención de la enfermedad. Un mapa de distribución de la FA en América del Sur de junio del 1998, mostrando las provincias, estados y departamentos con y sin (no hay informes de enfermedad clínica por lo menos de 24 meses) la enfermedad es dado como un ejemplo.

**Methodological bases for the characterization of risk - [Bases metodológicas para a caracterização de risco].**

Methodologies for determining disease risk in livestock are discussed with reference to the concept of risk; the qualitative and quantitative evaluation, management and communication of risk; risk analysis, taking into account the disease prevalence in the country concerned, animal products and exports; and risk analysis as a means of disease prevention. A distribution map of aphthous fever [foot-and-mouth disease] in South America for June 1998, showing the provinces, states and departments with and without (no reports of clinical disease for at least 24 months) the disease is given as an example.

**SEVILLA N, RUIZ JARABO CM, GOMEZ MARIANO G, BARANOWSKI E, DOMINGO E.**

Journal of General Virology 1998; 79 (12): 2971-2980. Centro de Biología Molecular 'Severo Ochoa', Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain.

**Un virus RNA puede adaptarse a la multiplicidad de la infección.**

Evidencia directa mostró que la forma relativa de 2 subpoblaciones competidoras de los virus RNA pueden depender de la multiplicidad de infección (m.d.i.). Dos subpoblaciones estrechamente relacionadas del virus de la fiebre aftosa (VFA) del serotipo C, que diferían en su historia de pasajes citolíticos en células BHK-21, fueron sometidas a experimentos de competición de crecimiento en células BHK-21. Una de las poblaciones,

**An RNA virus can adapt to the multiplicity of infection.**

Direct evidence showed that the relative fitness of 2 competing subpopulations of RNA viruses may depend on the multiplicity of infection (m.o.i.). Two closely-related subpopulations of foot-and-mouth disease virus (FMDV) of serotype C, which differed in their history of cytolitic passages in BHK-21 cells, were subjected to growth-competition experiments in BHK-21 cells. One of the populations, termed S, showed a selective

denominada S, mostró una ventaja selectiva sobre la otra población, denominada L, solo cuando los pasajes de competición eran cargadas en baja m.d.i. En contraste, ambas poblaciones, L y S, coexistían durante pasajes de serie cargadas a alta m.d.i. Ninguna diferencia entre S y L fue detectada en ensayos de inhibición de infectividad por péptidos sintéticos, en experimentos de competición de célula acoplada, o en virulencia para células BHK-21. Sin embargo, el VFA S demostró aumento de heparina acoplada comparada con L, y virulencia más alta de L para el ovario de hamster chino que las células de ovario S. Estos resultados con el VFA sugieren que pequeñas diferencias en la interacción del virus con la célula hospedadora pueden contribuir a una m.d.i. una ventaja selectiva dependiente de una subpoblación viral sobre una subpoblación estrechamente relacionada. Por consiguiente, mutantes virales de quasispecies replicadas in vivo pueden ser seleccionadas dependiendo del número de virus variantes relativos al número de células susceptibles.

advantage over the other population, termed L, only when the competition passages were carried out at low m.o.i. In contrast, both populations, L and S, coexisted during serial passages carried out at high m.o.i. No differences between S and L were detected in assays of inhibition of infectivity by synthetic peptides, in cell binding-competition experiments, or in virulence for BHK-21 cells. However, FMDV S showed increased heparin binding compared with L, and L higher virulence for Chinese hamster ovary cells than S. These results with FMDV suggest that small differences in the interaction of the virus with the host cell may contribute to an m.o.i.-dependent selective advantage of one viral subpopulation over a closely related subpopulation. Therefore, different viral mutants from quasispecies replicating in vivo may be selected depending on the number of variant viruses relative to the number of susceptible cells.

**SHEN F, CHEN PD, WALFIELD AM, YE J, HOUSE J, BROWN F, WANGN.**

Vaccine 1999; 17 (23-24): 3039-3049. United Biomedical, Inc, 25 Davids Drive, Hauppauge, NY 11788, USA.

**Diferenciación de animales convalecientes de aquellos vacunados contra la fiebre aftosa por un péptido ELISA.**

Determinantes antigénicos continuos dentro de las secuencias de aminoácido de la región no estructural conservada conteniendo proteínas 2C y 3ABC del virus de la fiebre aftosa, los cuales pueden distinguirse entre el suero de animales vacunados y animales infectados, fueron

**Differentiation of convalescent animals from those vaccinated against foot-and-mouth disease by a peptide ELISA.**

Continuous antigenic determinants within the amino acid sequences of the conserved non-structural region containing proteins 2C and 3ABC of foot-and-mouth disease virus which can distinguish between the sera from vaccinated and infected animals were

identificados. Un ELISA basado en un péptido 3B presentó una reacción positiva con suero de bovinos, cerdos, ovejas y cobayos infectados con todos los siete serotipos del virus, mas no con suero de animales vacunados. En experimentos con bovinos y cerdos para determinar la duración de la respuesta del anticuerpo, las reacciones positivas fueron obtenidas hasta un año después de la infección. Las ventajas de usar péptidos de las proteínas virales no estructurales en vez de proteínas recombinantes para vacunación diferenciada de animales infectados, incluye la especificidad de ellos, la no reactividad con anticuerpos contra las proteínas derivadas de las células hospedadoras (p.e. proteínas coli y de células de insectos), y la facilidad de preparación.

identified. An ELISA based on a 3B peptide gave a positive reaction with sera from cattle, pigs, sheep and guineapigs infected with all seven serotypes of the virus, but not with sera from vaccinated animals. In experiments with cattle and pigs to determine the duration of the antibody response, positive reactions were obtained as late as one year after infection. The advantages of using peptides from the non-structural viral proteins instead of recombinant proteins for differentiating vaccinated from infected animals include their specificity, non-reactivity with antibodies against host cell-derived proteins (e.g. E. coli and insect cell proteins), and their ease of preparation.

**SORENSEN KJ, MADSEN KG, MADSEN ES, SALT JS, NQINDI J, MACKAY DKJ.**

Archives of Virology 1998; 143 (8): 1461-1476. Danish Veterinary Institute for Virus Research, Kalvehave, Denmark.

**Diferenciación entre infección y vacunación contra la fiebre aftosa a través de la detección de anticuerpos por las proteínas no estructurales 3D, 3AB y 3ABC en ELISA usando antígenos expresados en baculovirus.**

Las proteínas no estructurales (PNS) 3D, 3AB y 3ABC del virus de la fiebre aftosa (VFA) fueron usadas como antígenos para bloquear ELISAs para detección de anticuerpo en bovinos y ovejas de acuerdo a la vacunación y/o infección con el VFA. El sistema de expresión del baculovirus se mostró eficiente en expresar los 3 PNS como antígenos reconocidos por suero inmune en ELISA. Los ELISAs 3D, 3AB y 3ABC detectaron anticuerpos del día 8 y 10 después de la infección experimental de bovinos y ovejas

**Differentiation of infection from vaccination in foot-and-mouth disease by the detection of antibodies to the non-structural proteins 3D, 3AB and 3ABC in ELISA using antigens expressed in baculovirus.**

The 3D, 3AB and 3ABC non-structural proteins (NSP) of foot-and-mouth disease virus (FMDV) were used as antigens in blocking ELISAs for antibody detection in cattle and sheep following vaccination and/or infection with FMDV. The baculovirus expression system was efficient at expressing the 3 NSPs as antigens recognized by immune sera in ELISA. The 3D, 3AB and 3ABC ELISAs detected antibodies from day 8 and 10 after experimental infection of susceptible cattle and

susceptibles, respectivamente, y los bovinos permanecieron sueropositivos por más de 395 días. Los ELISAs detectaron anticuerpos contra cualquier de los 7 serotipos del VFA. El ELISA 3D fue específico y preciso y tan susceptible como los ELISAs establecidos los cuales miden el anticuerpo a las proteínas estructurales. El ensayo puede ser usado como un recurso económico alternativo para ELISAs establecidos. Los ELISAs 3AB y 3ABC también fueron específicos y precisos. Los bovinos infectados por el VFA podrían ser diferenciados de los bovinos vacunados ya que presentaron un resultado positivo en ambos ELISAs 3AB y 3ABC. Dos bovinos que habían sido vacunados e infectados también presentaron resultados positivos en ambas pruebas, sugiriendo que los ELISAs 3AB y 3ABC, excepto el ELISA 3D, podrían representar un medio confiable de detectar infección en la población vacunada.

sheep, respectively, and cattle remained seropositive for more than 395 days. The ELISAs detected antibodies against any of the 7 serotypes of FMDV. The 3D ELISA was specific and precise and as sensitive as established ELISAs which measure antibody to structural proteins. The assay may be used as a resource saving alternative to established ELISAs. The 3AB and 3ABC ELISAs were also specific and precise. FMDV-infected cattle could be differentiated from vaccinated cattle as they gave a positive result in both the 3AB and the 3ABC ELISAs. Two cattle that had been both vaccinated and infected also gave positive results in both tests, suggesting that the 3AB and 3ABC ELISAs, but not the 3D ELISA, might represent a reliable means of detecting infection in a vaccinated population.

#### **TOJA M, ESCARMIS C, DOMINGO E.**

Virus Research 1999; 64 (2): 161-171. Centro de Biología Molecular 'Severo Ochoa' (CSIC-UAM), Universidad Autónoma de Madrid, 28049-Cantoblanco, Madrid, Spain.

**Secuencia genómica de nucleótido de un clon de virus de la fiebre aftosa y sus derivados persistentes. Implicaciones para la evolución de quasispecies virales durante una infección persistente.**

La secuencia del nucleótido del genoma entero del virus de la fiebre aftosa (VFA) (clon biológico C-S8c1) ha sido completada, y comparada con aquellas de dos derivados persistentes R99 y R146, rescatadas después de 99 y 146 pasajes de las células cargadoras BHK-21. Secuencias consensuales fueron determinadas directamente de los sobrenadantes de células

**Genomic nucleotide sequence of a foot-and-mouth disease virus clone and its persistent derivatives. Implications for the evolution of viral quasispecies during a persistent infection.**

The consensus nucleotide sequence of the entire genome of foot-and-mouth disease virus (FMDV) (biological clone C-S8c1) has been completed, and compared with that of two persistent derivatives R99 and R146, rescued after 99 and 146 passages of the carrier BHK-21 cells. Consensus sequences were determined directly from supernatants of persistently infected cells,

persistentemente infectadas, sin intervenir en la amplificación citolítica de los virus. Estas secuencias genómicas también han sido comparadas con aquellas del VFA R100, un virus que también fue rescatado de células persistentemente infectadas antes de la secuencia. Frecuencias en la mutación para R99 y R146 relativas a C-S8c1 alcanzaron una media de sustituciones por nucleótido de  $2.8 \times 10^{-3}$  para  $7.7 \times 10^{-3}$  por 5'UTR y las regiones codificadas L-, P1-, P2- y P3. Ninguna mutación fue fijada en la región polimerasa de código (3D). Contrastes agudos fueron observados con relación a la distribución de tipos de mutación a lo largo de los genomas persistentes, notablemente la completa ausencia de las mutaciones de transversión dentro de 5'-UTR, comparados con 53% transversiones en las regiones codificadas L- y P1. Los resultados de secuenciamiento presentados aquí, combinados con secuencias previas de los genomas del VFA C-S8c1 en el comienzo de la persistencia, proveen la evidencia de fluctuaciones de secuencia con una acumulación no lineal de mutaciones durante la persistencia prolongada, una marca de calidad de quasispecies dinámicas.

without intervening cytolitic amplification of the viruses. These genomic sequences have also been compared with that of FMDV R100, a virus that was also rescued from persistently infected cells, but that was subjected to cytolitic amplification before sequencing. Mutation frequencies for R99 and R146 relative to C-S8c1 were in the range of  $2.8 \times 10^{-3}$  to  $7.7 \times 10^{-3}$  substitutions per nucleotide for the 5'-UTR and the L-, P1-, P2- and P3-coding regions. No mutations were fixed in the polymerase (3D)-coding region. Striking contrasts were noted regarding the distribution of mutation types along the persistent genomes, notably the complete absence of transversion mutations within the 5'-UTR, compared with 53% transversions in the L- and P1-coding regions. The sequencing results presented here, combined with previous sequences of FMDV C-S8c1 genomes at the onset of persistence, provide evidence of sequence fluctuations with a non-linear accumulation of mutations during prolonged persistence, a hallmark of quasispecies dynamics.