

---

# BOLETIN

## del centro panamericano de fiebre aftosa

---

N<sup>os</sup>. 19-20, julio-diciembre, 1975.

Nos. 19-20, July-December, 1975.

contenido

contents

p.

Vacunas contra la fiebre aftosa. I. Comparación entre vacunas preparadas con virus inactivado con formalina y adsorbido en hidróxido de aluminio y vacunas preparadas con virus inactivado con acetiletileneimina emulsificado con adyuvante incompleto de Freund .....	1
<i>Centro de Enfermedades de Animales de Plum Island</i>	
<i>Centro Panamericano de Fiebre Aftosa</i>	
Foot-and-mouth disease vaccines. I. Comparison of vaccines prepared from virus inactivated with formalin and adsorbed on aluminum hydroxide gel with saponin and virus inactivated with acetyleneimine and emulsified with incomplete Freund's adjuvant .....	9
<i>The Plum Island Animal Disease Center</i>	
<i>Pan American Foot-and-Mouth Disease Center</i>	

Vacunas contra la fiebre aftosa. II. Estudios sobre la duración de la inmunidad en bovinos y porcinos .....	17
<i>Centro de Enfermedades de Animales de Plum Island</i>	
<i>Centro Panamericano de Fiebre Aftosa</i>	
Foot-and-mouth disease vaccines. II. Studies on the duration of immunity in cattle and pigs .....	24
<i>The Plum Island Animal Disease Center</i>	
<i>Pan American Foot-and-Mouth Disease Center</i>	
Aplicación en el campo de vacuna antiaftosa oleosa e inac- tivada: vacunación y revacunación de bovinos jóvenes .....	31
<i>P. Augé de Mello; Vicente Astudillo; Ivo Gomes;</i>	
<i>J.T. Campos Garcia</i>	
Field application of inactivated oil adjuvanted foot-and- mouth disease virus vaccine: vaccination and revac- cination of young cattle .....	39
<i>P. Augé de Mello; Vicente Astudillo; Ivo Gomes;</i>	
<i>J.T. Campos Garcia</i>	
Resúmenes - Abstracts .....	48
Bibliografía sobre enfermedades vesiculares	
Vesicular disease bibliography .....	55

CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA  
Caixa Postal 589 ZC-00, 20 000 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

VACUNAS CONTRA LA FIEBRE AFTOSA. I. COMPARACION ENTRE VACUNAS  
PREPARADAS CON VIRUS INACTIVADO CON FORMALINA Y ADSORBIDO EN  
HIDROXIDO DE ALUMINIO Y VACUNAS PREPARADAS CON VIRUS INACTIVADO CON  
ACETILETILENEIMINA EMULSIFICADO CON ADYUVANTE INCOMPLETO DE FREUND

por el

Centro de Enfermedades de Animales de Plum Island\*

y el

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa\*\*

INTRODUCCION

En Sudamérica las vacunas para el control de la fiebre aftosa (FA) se preparan mediante inactivación de suspensiones de virus con formaldehído o acetiletileneimina (AEI), absorbiendo el antígeno a hidróxido de aluminio y agregando saponina. La inmunidad que confiere esta vacuna es de una duración relativamente corta por lo que es práctica corriente revacunar a los animales cada 4 meses. Con este tipo de vacuna es particularmente difícil proteger a los cerdos (1, 2).

Investigadores del Centro de Enfermedades de Animales de Plum Island (PIADC) comunicaron resultados favorables con vacuna contra la fiebre aftosa preparada con

antígenos inactivados con AEI y emulsificados con adyuvante incompleto de Freund (3, 4, 5). En las unidades de aislamiento del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (CPFA), en Rio de Janeiro, se realizó una serie de estudios en colaboración con el PIADC, para determinar el valor de tales vacunas para futuros experimentos de campo en Sudamérica. Bovinos, ovinos y porcinos de Brasil fueron vacunados con vacunas convencionales de fiebre aftosa con formaldehído y con adyuvante de gel de hidróxido de aluminio y saponina, o con vacunas inactivadas con AEI y con adyuvante incompleto de Freund. Se compararon el desarrollo de anticuerpos y el grado de inmunidad de los animales con uno y otro tipo de vacunas, en diferentes períodos después de la vacunación.

---

\* McKercher, P.D.; Graves, J.H.; Cunliffe, H.; Callis, J.J. ARS, USDA, Plum Island Animal Disease Center, P.O. Box 848, Greenport, New York 11944, U.S.A.

\*\* Fernandes, M.V.; Martins, I.A.; Alonso Fernández, A.; Gomes, I.; Augé de Mello, P.; Palacios, C.A. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, OPS, Caixa Postal 589, ZC-00, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

"La mención de una marca registrada o de propiedad de un producto no constituye una certificación de garantía de ese producto por parte del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América ni implica su aprobación ni la exclusión de otros productos utilizables con fines similares."

## MATERIALES Y METODOS

## 1. Virus

Para la preparación de las vacunas se seleccionaron las siguientes cepas sudamericanas de virus de la fiebre aftosa: cepa Caseros del subtipo O<sub>1</sub>, cepa Cruzeiro del subtipo A<sub>24</sub> y cepa Resende del subtipo C<sub>3</sub>.

## 2. Vacunas

a) El Centro Panamericano de Fiebre Aftosa preparó una vacuna trivalente de hidróxido de aluminio y saponina con la suspensión de virus producido en cultivos Frenkel de epitelio lingual bovino e inactivado con 0,025% de formaldehído a 37° C durante 40 horas (6). En la Tabla 1 se describen las características de los antígenos antes de la inactivación.

b) El Centro de Enfermedades de Animales de Plum Island preparó otra vacuna trivalente, utilizando los mismos virus emulsificados con un adyuvante oleoso. Los virus fueron multiplicados en cultivos celulares de riñón de hamster (criceto) lactante

(BHK-21, clon 13), inactivado con 0,05% de AEI a 37° C durante 48 horas y emulsificado en igual cantidad de adyuvante oleoso (1 parte de Arlacel A y 9 partes de Bayol F) (5). En la Tabla 1 figuran las características de los antígenos.

En esta publicación las vacunas se mencionaron como vacunas de gel de aluminio y de adyuvante oleoso, respectivamente.

## 3. Pruebas de inocuidad de los antígenos

En el PIADC se mezclaron partes iguales de cada suspensión inactivada para la preparación de vacunas de adyuvante oleoso y un total de 2 ml de la suspensión trivalente se inoculó por vía intradermolingual (IDL) en 20 puntos de cada uno de 6 novillos. Durante un periodo de observación de 14 días todos permanecieron negativos para signos de fiebre aftosa.

La vacuna de gel de aluminio del CPFA, diluida en 1/5, se inoculó en 100 ratones lactantes a razón de 0,05 ml por ratón. Ninguno murió durante un periodo de observación de 10 días.

TABLA 1 - Títulos de infecciosidad y de fijación del complemento de las cepas de virus aftoso utilizadas para la producción de vacunas experimentales

Subtipo	Centro de Enfermedades de Animales de Plum Island (Cultivo BHK-21)		Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (Cultivo Frenkel)	
	UFP/ml <sup>a)</sup>	FC <sup>b)</sup> /Dosis vacunal	DL <sub>50</sub> ratón/dosis vacunal	FC <sup>c)</sup>
O <sub>1</sub>	7,57	1/18,9	7,30	1/6,5
A <sub>24</sub>	6,87	1/14,7	7,70	1/3
C <sub>3</sub>	7,43	1/18,0	7,57	1/16

a) UFP = log<sub>10</sub> unidades formadoras de placas por ml.

b) Cowan, K.M.; Trautman, R. Immunochemical studies of foot-and-mouth disease. I. Complement fixation reactions of isolated antigenic components. *J. Immunol.* 99: 729-736, 1967.

c) Alonso Fernández, A.; Federer, K.E.; Gomes, I.; Vieira, A. Comparación serológica e inmunológica de dos subtipos del virus aftoso tipo C Waldmann. *Bltm Centro Panamericano de Fiebre Aftosa* 4: 9-20, 1971.

#### 4. Prueba de inocuidad de la vacuna

Un volumen de 2 ml de la vacuna final envasada, con adyuvante oleoso, se inoculó en el epitelio lingual de 6 novillos en 20 puntos cada uno. A lo largo de un período de observación de 14 días todos permanecieron negativos para signos de fiebre aftosa.

#### 5. Pruebas de potencia

En el PIADC fueron vacunados, con 2 ml de vacuna, 6 bovinos, 6 ovinos y 6 cerdos. A los bovinos y ovinos la vacuna fue aplicada por vía subcutánea en un lado del pescuelo y a los cerdos, por la misma vía, en el dorso de la oreja. Se recogieron muestras de sangre para examen de anticuerpos neutralizantes a los 7, 14, 21 y 28 días después de la vacunación.

En el CPFA se realizó una prueba de potencia para la vacuna de gel de aluminio, empleando 23 bovinos. Estos fueron expuestos al virus 21 días después de la vacunación, por inoculación IDL de  $10^4$  DL<sub>50</sub> ratón.

#### 6. Animales

En el experimento se utilizaron bovinos mestizos de cebú de aproximadamente 2 años de edad y 200 kg de peso, ovinos merino/corriedale de 8 a 9 meses y 20 a 25 kg de peso, y cerdos Landrace de 3 a 4 meses y 30 a 40 kg. En todos los animales los exámenes realizados previamente para determinar la presencia de anticuerpos contra los tres subtipos usados, resultaron negativos.

#### 7. Vacunación

Se empleó un total de 432 animales en estos experimentos:

a) 32 bovinos inoculados por vía subcutánea con 5 ml de vacuna de gel de aluminio cada uno.

b) 32 bovinos inoculados por vía subcutánea con 6 ml de vacuna de adyuvante oleoso.

c) 32 bovinos se mantuvieron sin vacunar para ser utilizados como controles en el momento de comprobación de la inmunidad de los bovinos vacunados.

d) 64 ovinos fueron inoculados por vía subcutánea con 5 ml de vacuna de gel de aluminio.

e) 48 ovinos se inocularon por vía subcutánea con 6 ml de la vacuna de adyuvante oleoso.

f) 56 ovinos se dejaron sin vacunar para ser usados como controles en la comprobación de la inmunidad de los diversos grupos.

g) 64 porcinos recibieron 5 ml de vacuna de gel de aluminio.

h) 48 porcinos recibieron 6 ml de vacuna de adyuvante oleoso.

i) 56 porcinos se dejaron sin vacunar como controles para la comprobación de la inmunidad de los diversos grupos.

#### 8. Prueba de anticuerpos

Todos los animales fueron sangrados con intervalos de un mes. Los sueros bovinos se examinaron frente al subtipo C<sub>3</sub> y los de ovinos y porcinos contra el O<sub>1</sub>, aplicando la prueba de protección en ratones de acuerdo con el método descrito (7). Los valores DP<sub>50</sub> de los sueros de los animales del PIADC se determinaron en ratones lactantes, según se describió (8), utilizando los tres tipos de virus.

#### 9. Exposición al virus

Los bovinos fueron inoculados en el epitelio lingual con  $10^4$  DL<sub>50</sub> ratón del subtipo C<sub>3</sub> de origen bovino. Los ovinos se inocularon de igual modo con  $10^5$  DL<sub>50</sub> ratón del subtipo O<sub>1</sub>, pasado 6 veces en ovinos según descrito (9). Los cerdos recibieron por vía intraplantar, en una pata,  $10^{4,6}$  DL<sub>50</sub> ratón del subtipo O<sub>1</sub> de origen bovino. Se consideró que los animales estaban protegidos cuando no aparecían lesiones secundarias en las patas. En los cerdos se tomaban en consideración las patas no inoculadas.

## RESULTADOS

En la Tabla 2 aparecen los resultados de los exámenes de anticuerpos séricos (media de los puntos finales de  $DP_{50}$ ) de los animales empleados en las pruebas de potencia del PIADC. Estos resultados indican que la vacuna estaba en el límite de calidad, lo que se confirmó en la exposición de los bovinos al virus: 4 de 12 desarrollaron fiebre aftosa (Tabla 3).

En el CPFA las pruebas de potencia de las vacunas de gel de aluminio, llevadas a cabo en bovinos en la descarga realizada a los 21 días postvacunación, mostraron que 7 de 7 bovinos estaban protegidos contra el virus tipo O; 7 de 8 contra el virus de tipo A, y 8 de 8 contra el virus tipo C.

Los resultados de los estudios de anticuerpos y de la inoculación del virus para las tres especies se ven en la Tabla 4 y Fig. 1.

*Bovinos*

En la Fig. 1 se observa que la respues-

ta primaria de anticuerpos contra el subtipo  $C_3$ , tanto de la vacuna de gel de aluminio como de la de adyuvante oleoso, fue muy pobre y de corta duración; siendo la protección conferida a los tres meses de la vacunación muy baja. Sin embargo, la revacunación con ambos tipos de vacuna aumentó considerablemente la respuesta de anticuerpos, reflejado en el grado de resistencia ante la exposición al subtipo  $C_3$ , 3 y 7 meses después de la revacunación (Tabla 4).

*Ovinos*

La respuesta primaria de los ovinos fue diferente según la vacuna (Fig. 1). Con la vacuna de gel de aluminio la curva de anticuerpos para el subtipo  $O_1$  alcanzó su pico al mes, pero con la vacuna de adyuvante oleoso la curva continuó subiendo hasta los tres meses, seguido por una meseta alta y prolongada. Con la vacuna oleosa se obtuvo un excelente grado de protección hasta 9 meses después de la vacunación contra el virus de la fiebre aftosa subtipo  $O_1$ .

TABLA 2 - Media del punto final  $DP_{50}$ <sup>a)</sup> en pruebas de potencia, en seis animales, por especie

Virus tipo	DPV <sup>b)</sup>	Bovinos	Ovinos	Porcinos
$O_1$	28	1,57	1,71	1,77
$A_{24}$	28	1,89	1,50	1,88
$C_3$	28	1,20	2,24	0,94

a)  $DP_{50}$  =  $\log_{10}$  de la recíproca de la dilución de suero que protege el 50% de los ratones contra 100 DL<sub>50</sub> de virus.

b) DPV = Días postvacunación.

TABLA 3 - Prueba de potencia en bovinos - Respuesta a la descarga del subtipo O<sub>1</sub> en relación con el nivel de la DP<sub>50</sub>

Nivel de DP <sub>50</sub>	Número de bovinos	Lesiones		Fiebre aftosa generalizada
		Ninguna	En el sitio de inoculación	
0 (Control)	3	0	3	3
0,0 - 0,49	1	0	1	1
0,50 - 0,99	1	0	1	1
1,00 - 1,49	1	0	1	1
1,50 - 1,99	2	0	2	1
2,00 - 2,49	4	2	2	0
2,50 - 2,99	2	1	1	0
3,00 - 3,49	1	1	0	0

TABLA 4 - Pruebas de inmunidad - Número de animales protegidos

Especie	Meses	Vacuna	
		Gel de aluminio	Adyuvante oleoso
Bovinos	3	4/15	5/15
	3a)	8/8	8/8
	7a)	4/8	6/8
Ovinos	1	16/16	-
	3	16/16	14/16
	6	15/16	13/16
	9	13/13	13/14
Porcinos	3	0/16	0/16
	1a)	0/12	4/12
	3a)	-	2/9

a) Meses después de la revacunación.

#### Porcinos

Ambas vacunas sólo produjeron una respuesta mínima de anticuerpos después de la vacunación, y a los tres meses ninguno de los cerdos expuestos estaba protegido contra el subtipo O<sub>1</sub> (Tabla 4 y Fig. 1). La revacunación con la vacuna de gel de

aluminio aumentó un poco el nivel de anticuerpos, sin que protegiera a los cerdos a la exposición del virus un mes más tarde. La respuesta de la revacunación con vacuna de adyuvante oleoso fue un poco mejor, en cuanto al desarrollo de anticuerpos y a la protección frente al virus.

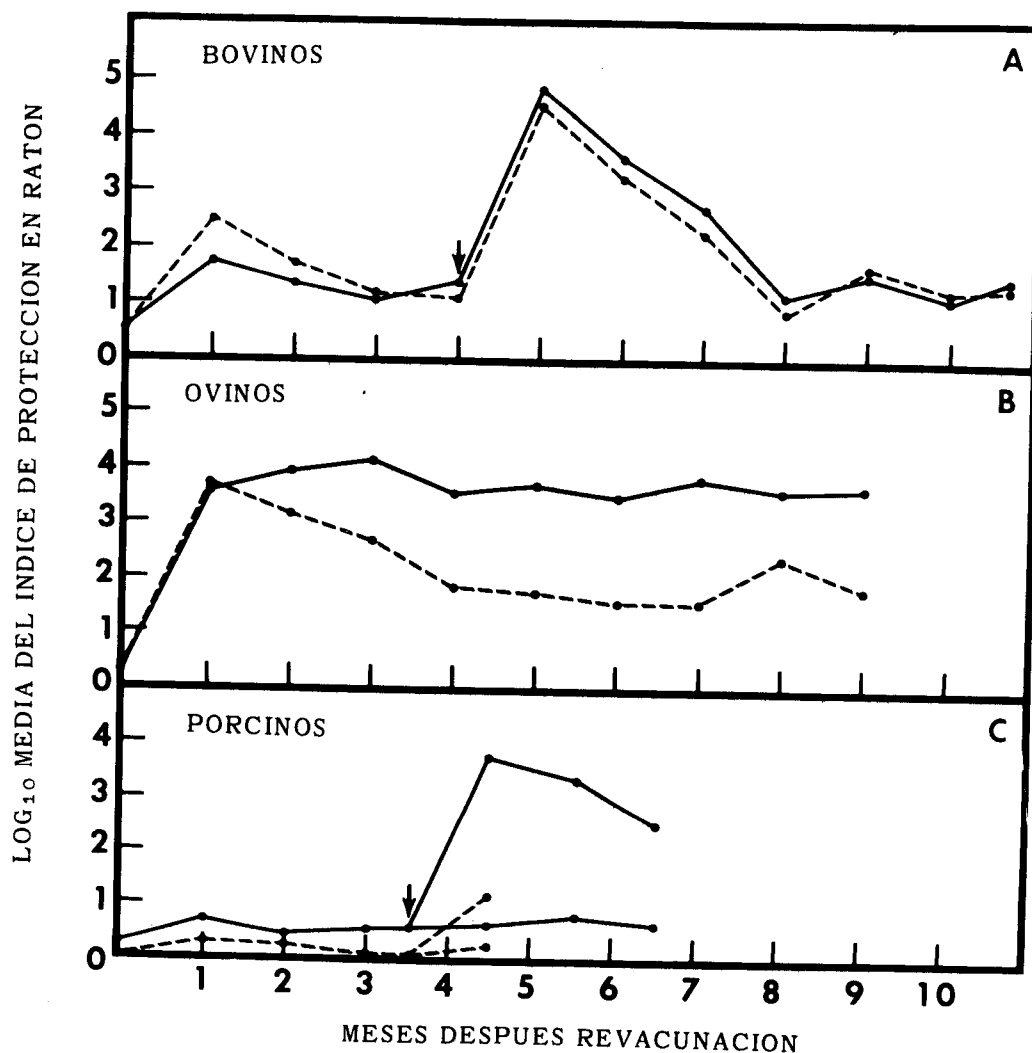


FIGURA 1 - Media del índice de protección en ratón en especies vacunadas con vacunas antiaftosas inactivadas con formalina y con adyuvante de hidróxido de aluminio-saponina (-----) y con vacuna inactivada con acetiltileneimina y emulsificada con adyuvante incompleto de Freund (—): A, respuesta en bovinos al virus aftoso C<sub>3</sub>, revacunados a los 120 días; B, respuesta en ovinos al virus aftoso O<sub>1</sub>; C, respuesta en cerdos al virus O<sub>1</sub>, revacunados a los 105 días.

↓ = Revacunación.



## DISCUSION

La respuesta a la vacuna de adyuvante oleoso fue menos favorable que la informada anteriormente (10, 11, 12), tanto en las pruebas de potencia (Tabla 2) como en la aplicación en el CPFA (Tabla 4). Se puede especular sobre la insuficiente cantidad de antígeno contenido en la vacuna o sobre la pobreza de los subtipos usados como antígenos. Graves (13) señaló que en la descarga de virus puede esperarse algún indicio de enfermedad cuando el promedio de  $DP_{50}$  es inferior a 2. En el caso del virus  $C_3$  se observó poca diferencia en la respuesta de los bovinos vacunados o revacunados con vacunas con gel de aluminio o con adyuvante oleoso. En los ovinos se consiguió un resultado más prometedor con la vacuna oleosa. En esta especie la vacuna de gel de aluminio produjo una defensa adecuada contra el subtipo  $O_1$ , pero los niveles correspondientes de anticuerpos fueron considerablemente menores que los obtenidos con la vacuna de adyuvante oleoso. En los cerdos se obtuvieron resultados pobres con estos subtipos, con ambos tipos de vacuna, pero, la revacunación fue algo mejor en el caso de la vacuna oleosa. Los síntomas clínicos a la exposición al virus de los cerdos inoculados con vacuna oleosa eran menos graves que los de los controles, observándose cierto grado de protección.

La estabilidad de la vacuna se reveló muy satisfactoria. Después de la prueba de potencia en el PIADC y la prueba de revacunación en el CPFA, la vacuna se devolvió al PIADC para exámenes de fijación del complemento e inoculación en animales. Los

resultados fueron similares a los obtenidos originalmente. No obstante, será necesario mejorar la preparación de la vacuna antes de considerar su aplicación en el campo. El mejoramiento podría incluir un aumento de la cantidad y de la estabilidad de los antígenos y extender la posibilidad de su almacenamiento por más de seis meses para que se mantenga un buen estado de emulsificación.

## RESUMEN

La respuesta de anticuerpos en bovinos frente al virus  $C_3$ , sea con vacunas de hidróxido de aluminio o de adyuvante oleoso, fue bastante escasa y de corta duración. La revacunación con los dos tipos de vacuna aumentó considerablemente la respuesta.

En ovinos, los niveles de anticuerpos contra el virus  $O_1$  después de la vacunación con vacuna de hidróxido de aluminio alcanzó su máximo al mes. La vacuna oleosa produjo una excelente protección contra el virus  $O_1$  por no menos de 9 meses.

Ambas vacunas indujeron una mínima respuesta de anticuerpos en cerdos, pero en los animales inoculados con la vacuna oleosa los signos clínicos fueron menos severos que en los testigos.

Los resultados obtenidos con la vacuna oleosa fueron menos favorables de lo que se esperaba. Es probable que la cantidad de antígeno contenida en la vacuna fuera insuficiente o que los subtipos utilizados fueron antígenos pobres.

## REFERENCIAS

1. VAN BEKKUM, J.G.; FRENKEL, S.; NATHANS, I. De enting van varkens tegen mond- en klauwzeer. *Tijdschr. v. Diergeneesk.* 25: 1936-1944, 1963.

2. LUCAM, F.; FEDIDA, M.; DANNACHER, G.; PERRAUD, J. What may be expected concerning foot-and-mouth disease vaccination in pigs. Report of the Meeting of the Research Group of the Standing Technical Committee, European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, held in Pirbright, England, September 14-16, 1966, 187-201, 1966.
3. MCKERCHER, P.D.; GIORDANO, A.R. Foot-and-mouth disease in swine. I. The immune response of swine to chemically-treated and non-treated foot-and-mouth disease virus. Report of the Meeting of the Research Group of the Standing Technical Committee, European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, held in Pirbright, England, September 14-16, 170-186, 1966.
4. MCKERCHER, P.D.; GIORDANO, A.R. Immune response of steers inoculated with chemically-treated foot-and-mouth disease virus preparations previously studied in swine. *Arch. ges. Virusforsch.* 20: 190-197, 1967.
5. GRAVES, J.H.; MCKERCHER, P.D.; FARRIS, Jr., H.E.; COWAN, K.M. Early response of cattle and swine to inactivated foot-and-mouth disease vaccine. *Res. vet. Sci.* 9: 35-40, 1968.
6. ABREU, MARTINS I. Vacunas antiaftosas hidróxido-saponinadas inactivadas por el formol. *Bltm Centro Panamericano de Fiebre Aftosa* 1: 1-19, 1971.
7. CUNHA, R.G.; BAPTISTA, Jr. J.A.; SERRÃO, U.M.; TORTURELLA, I. El uso de los ratones lactantes en la evaluación de los anticuerpos contra el virus de la fiebre aftosa y su significación inmunológica. *Gac. vet.* 19: 243-267, 1957.
8. CUNLIFFE, H.R.; GRAVES, J.H. Formalin-treated foot-and-mouth disease virus: comparison of two adjuvants in cattle. *Can. J. comp. Med. vet. Sci.* 27: 193-196, 1963.
9. ALONSO FERNANDEZ, A.; FERNANDES, M.V. Experimental inoculation of sheep with foot-and-mouth disease virus. *Bull. Off. int. Epiz.* 73: 507-520, 1970.
10. MCKERCHER, P.D.; GAILIUNAS, P. Response of swine to inactivated foot-and-mouth disease vaccine. Duration of immunity and local tissue reaction. *Arch. ges. Virusforsch.* 28: 165-176, 1969.
11. MORGAN, D.O.; MCKERCHER, P.D.; BACHRACH, H.L. Quantitation of the antigenicity and immunogenicity of purified foot-and-mouth disease virus vaccine for swine and steers. *Appl. Microbiol.* 70: 770-774, 1970.
12. RIVENSON, S.; IBARRA, O.; GAGGINO, O.P.; LAPORTE, O.; GARCIA OLANO, H.; PIZZI, J.C.; MARANGUNICH, L. Estudio comparativo con un nuevo tipo de vacuna antiaftosa oleosa en bovinos. *Revta Invest. Agrop., INTA, Buenos Aires, Rep. Argentina. Serie 4 Patología Animal, IX* (2), 1972.
13. GRAVES, J.H. Immune response of cattle to different serotype antigens in monovalent foot-and-mouth disease vaccines. *J. Immun.* 102: 58-62, 1969.

FOOT-AND-MOUTH DISEASE VACCINES. I. COMPARISON OF VACCINES PREPARED  
FROM VIRUS INACTIVATED WITH FORMALIN AND ADSORBED ON ALUMINUM  
HYDROXIDE GEL WITH SAPONIN AND VIRUS INACTIVATED WITH  
ACETYLETHYLENEIMINE AND EMULSIFIED WITH INCOMPLETE FREUND'S ADJUVANT

by

The Plum Island Animal Disease Center\*

and

Pan American Foot-and-Mouth Disease Center\*\*

INTRODUCTION

Vaccines for the control of foot-and-mouth disease (FMD) in South America are prepared by inactivating the virus suspensions with formaldehyde or acetyleneimine (AEI), absorbing the antigen to aluminum hydroxide gel and adding saponin. The duration of immunity obtained with this vaccine is relatively short, and repeated vaccinations at 4-month intervals are an accepted practice. Pigs are particularly difficult to protect with this type of vaccine (1, 2).

Scientists at the Plum Island Animal Disease Center (PIADC) reported favorable results with FMD vaccines prepared from virus inactivated with AEI and emul-

sified with incomplete Freund's adjuvant (3, 4, 5). A series of cooperative studies by PIADC and the Pan American Foot-and-Mouth Disease Center (PAFMDC) was undertaken in the isolation units at PAFMDC in Rio de Janeiro in an effort to determine the value of such vaccines for future field experiments in South America. Brazilian cattle, pigs and sheep were vaccinated with conventional formaldehyde-inactivated aluminum hydroxide gel-saponin adjuvanted FMD vaccines or with vaccines inactivated with AEI and emulsified with incomplete Freund's adjuvant. Antibody development and the degree of immunity of the animals at various times after vaccination and revaccination with two vaccines were compared.

---

\* P.D. McKercher, J.H. Graves, H. Cunliffe and J.J. Callis, ARS, USDA, Plum Island Animal Disease Center, P.O. Box 848, Greenport, New York 11944, U.S.A.

\*\* M.V. Fernandes, I.A. Martins, A. Alonso Fernández, I. Gomes, P. Augé de Mello and C.A. Palacios, Pan American Foot-and-Mouth Disease Center, PAHO - Caixa Postal 589, ZC-00, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

"Mention of a trademark or proprietary product does not constitute a guarantee or warranty of the product by the U.S. Department of Agriculture, and does not imply its approval to the exclusion of other products that may also be suitable."

## MATERIALS AND METHODS

## 1. Virus

The following South American FMD virus (FMDV) strains were selected for the preparation of the vaccine: subtype O<sub>1</sub>, strain Caseros; subtype A<sub>24</sub>, strain Cruzeiro; and subtype C<sub>3</sub>, strain Resende.

## 2. Vaccines

a) A trivalent aluminum hydroxide-saponin vaccine was prepared by the PAFMDC with the virus suspension produced in Frenkel cultures of bovine tongue epithelium and inactivated with 0.025% formaldehyde at 37° C for 40 hours (6). The characteristics of the antigens before inactivation are given in Table 1.

b) A trivalent vaccine in which the same viruses were used and which was emulsified with an oil adjuvant was prepared at PIADC. The viruses were grown in baby hamster kidney (BHK-21, clone 13) cell

cultures, inactivated with 0.05% AEI at 37° C for 48 hours and emulsified with equal parts of oil adjuvant (1 part Arlacel A and 9 parts Bayol F) (5). The characteristics of the antigens are shown in Table 1.

In this paper, the two vaccines will be referred to as aluminum-gel and oil-adjuvanted vaccines, respectively.

## 3. Innocuity tests

At the PIADC, equal portions of each inactivated antigen used for the oil-adjuvanted vaccines were mixed, and 2 ml of the trivalent suspension was inoculated intradermally (IDL) in 20 sites in each of 6 steers. All remained negative for signs of FMD for the 14-day observation period.

At the PAFMDC the aluminum-gel vaccine was inoculated in 100 suckling mice as a 1/5 dilution, 0.05 ml per mouse. None of the mice died during the 10-day observation period.

TABLE 1 - Infectivity and complement-fixation (CF) titers of FMD virus strains used for production of experimental vaccines

Subtype	Plum Island Animal Disease Center (BHK-21 culture)		Pan American Foot-and-Mouth Disease Center (Frenkel culture)	
	PFU/ml <sup>a)</sup>	CF <sup>b)</sup> /vaccine dose	Mouse LD <sub>50</sub> /vaccine dose	CF <sup>c)</sup>
O <sub>1</sub>	7.57	1/18.9	7.30	1/6.5
A <sub>24</sub>	6.87	1/14.7	7.70	1/3
C <sub>3</sub>	7.43	1/18.0	7.57	1/16

a) PFU = log<sub>10</sub> plaque-forming units/ml.

b) Cowan, K.M.; Trautman, R. Immunochemical studies of foot-and-mouth disease. I. Complement fixation reactions of isolated antigenic components. *J. Immunol.* 99: 729-736, 1967.

c) Alonso Fernández, A.; Federer, K.E.; Gomes, I.; Vieira, A. Comparación serológica e inmunológica de dos subtipos del virus aftoso tipo C Waldmann. *Bltm Centro Panamericano de Fiebre Aftosa* 4: 9-20, 1971.

#### 4. Vaccine safety test

Two ml of the final bottled oil-adjuvanted vaccine was inoculated into 20 sites into the tongue epithelium of each of 6 steers. All remained negative for signs of FMD during the 14-day observation period.

#### 5. Potency tests

At the PIADC, 6 cattle, 6 sheep and 6 pigs were each vaccinated with a 2-ml dose of the vaccine. Cattle and sheep were inoculated subcutaneously on the side of the neck, and the pigs subcutaneously on the back of the ear. Blood samples were collected 7, 14, 21 and 28 days after vaccination for the assay of neutralizing antibodies.

At the PAFMDC, the aluminum-gel vaccine was potency tested in 23 cattle, which were exposed to virus by IDL inoculation of  $10^4$  mouse LD<sub>50</sub> 21 days after vaccination.

#### 6. Animals

Cross-bred Zebu cattle, approximately 2 years of age and weighing approximately 200 kg; Merino/Corriedale sheep, 8 to 9 months of age and weighing 20 to 25 kg; and Landrace pigs, 3 to 4 months old and weighing 30 to 40 kg, were used in the experiment. All animals were previously tested for the presence of antibodies against the three subtypes used and were negative.

#### 7. Vaccination

A total of 432 animals were used in these experiments:

a) 32 cattle were each inoculated subcutaneously with 5 ml of aluminum-gel vaccine.

b) 32 cattle were each inoculated subcutaneously with 6 ml of oil-adjuvanted vaccine.

c) 32 cattle were retained as noninoculated control animals to be used when the

immunity of the various groups was challenged.

d) 64 sheep were each inoculated subcutaneously with 5 ml of aluminum-gel vaccine.

e) 48 sheep were each inoculated subcutaneously with 6 ml of oil-adjuvanted vaccine.

f) 56 sheep were retained as noninoculated controls to be used when the immunity of the various groups was challenged.

g) 64 pigs were each inoculated with 5 ml of aluminum-gel vaccine.

h) 48 pigs were each inoculated with 6 ml of oil-adjuvanted vaccine.

i) 56 pigs were retained as noninoculated control animals to be used when the immunity of the various groups was challenged.

#### 8. Antibody assay

Blood samples were collected from all animals at monthly intervals. Cattle sera were tested against FMDV, subtype C<sub>3</sub> and the sheep and pig sera against FMDV, subtype O<sub>1</sub>; the mouse protection test was used according to the method described (7). The PD<sub>50</sub> values of sera from the animals used at the PIADC were determined in suckling mice as described (8); the three types of virus were used.

#### 9. Virus exposure

The immunity of the cattle was challenged by IDL inoculation of  $10^4$  mouse LD<sub>50</sub> of FMDV, subtype C<sub>3</sub> of cattle origin. Sheep were similarly inoculated with  $10^5$  mouse LD<sub>50</sub> of FMDV, subtype O<sub>1</sub> that had been previously passed 6 times in sheep as described (9). Pigs were inoculated into the intraplantar region of one foot with  $10^{4.6}$  mouse LD<sub>50</sub> of FMDV, subtype O<sub>1</sub> of cattle origin. Animals were considered protected if secondary lesions such as foot lesions did not develop. In swine, this would include other than the inoculated foot.

## RESULTS

The results of the serum antibody tests ( $PD_{50}$  mean endpoints) of the animals used for the potency tests at the PIADC are given in Table 2. These results, which indicate that the vaccine was of borderline quality, were confirmed when these cattle were exposed and 4 out of 12 developed FMD (Table 3).

At the PAFMDC, the potency test of the aluminum-gel vaccine conducted in cattle, when their immunity was challenged at 21 days after vaccination, showed 7 of 7 cattle protected against FMDV type O, 7 of 8 against type A, and 8 of 8 against type C.

The results of the antibody studies and of virus exposure by inoculation for the three species are given in Table 4 and Fig. 1.

*Cattle*

Results in Fig. 1 show that the primary antibody response of the cattle against sub-

type C<sub>3</sub> of both the aluminum-gel type vaccine and the oil-adjuvanted vaccine was quite poor and of short duration, with little protection 3 months after vaccination. However, revaccination with both types of vaccine considerably increased the antibody response; this increased response was reflected in the degree of resistance to subtype C<sub>3</sub> exposure 3 and 7 months after revaccination (Table 4).

*Sheep*

The primary response of sheep was different for the aluminum-gel and the oil vaccines (Fig. 1). The aluminum-gel adjuvanted vaccine antibody levels against subtype O<sub>1</sub> reached a peak at 1 month, but the oil-adjuvanted vaccine antibody levels continued to rise for as long as 3 months after vaccination, followed by a prolonged high plateau. The degree of protection was excellent with the oil vaccine for as long as 9 months after vaccination against FMDV, subtype O<sub>1</sub>.

TABLE 2 -  $PD_{50}$ <sup>a)</sup> mean endpoint of six animals per species in potency test

Virus type	DPV <sup>b)</sup>	Cattle	Sheep	Pigs
O <sub>1</sub>	28	1.57	1.71	1.77
A <sub>24</sub>	28	1.89	1.50	1.88
C <sub>3</sub>	28	1.20	2.24	0.94

a)  $PD_{50}$  =  $\log_{10}$  of the reciprocal of the serum dilution protecting 50% of mice against 100 LD<sub>50</sub> of virus.

b) DPV = days postvaccination.

TABLE 3 - Response of cattle to potency test challenge with FMDV subtype O<sub>1</sub> in relation to PD<sub>50</sub> range

PD <sub>50</sub> range	Number of cattle	Lesions		
		None	At site of inoculation	Generalized FMD
0 (Control)	3	0	3	3
0.0 - 0.49	1	0	1	1
0.50 - 0.99	1	0	1	1
1.00 - 1.49	1	0	1	1
1.50 - 1.99	2	0	2	1
2.00 - 2.49	4	2	2	0
2.50 - 2.99	2	1	1	0
3.00 - 3.49	1	1	0	0

TABLE 4 - Number of animals protected on challenge of immunity

Species	Months	Vaccine	
		Aluminum-Gel	Oil-Adjuvanted
Cattle	3	4/15	5/15
	3a)	8/8	8/8
	7a)	4/8	6/8
Sheep	1	16/16	-
	3	16/16	14/16
	6	15/16	13/16
	9	13/13	13/14
Pigs	3	0/16	0/16
	1a)	0/12	4/12
	3a)	-	2/9

a) Months after revaccination.

*Pigs*

Both vaccines produced only a minimal antibody response after vaccination, and none of the pigs exposed to subtype O<sub>1</sub> at 3 months were protected (Table 4; Fig. 1). Revaccination with the aluminum-gel vaccine resulted in a slight increase in the level of antibodies; this increase afforded

no protection when these pigs were exposed to virus 1 month later. The response to the revaccination with oil-adjuvanted vaccine was slightly better than that obtained with the aluminum gel vaccine in regard to antibody development and protection to virus exposure.

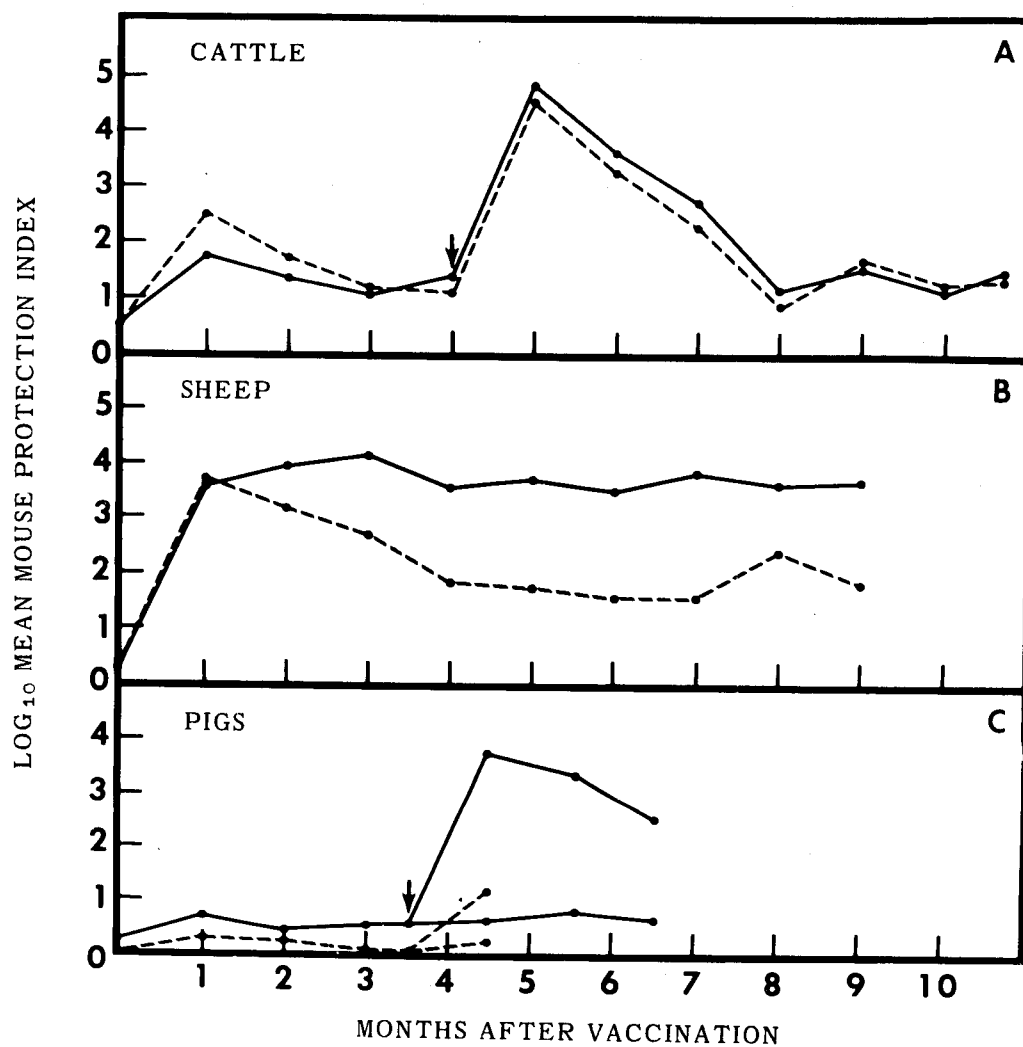


FIGURE 1 - Mean mouse protective index of species vaccinated with formalin-inactivated aluminum hydroxide gel-saponin adjuvanted (aluminum gel) FMD vaccine (-----) and acetyl-ethyleneimine inactivated (oil-adjuvanted) vaccine emulsified with incomplete Freund's adjuvant (—): A, response of cattle to FMDV C<sub>3</sub>, revaccinated at 120 days; B, response of sheep to FMDV O<sub>1</sub>; C, response of pigs to FMDV O<sub>1</sub>, revaccinated at 105 days.

↓ = Revaccination.



## DISCUSSION

The responses to oil-adjuvanted vaccine were less favorable than those reported earlier (10, 11, 12), in both the actual use at the PAFMDC (Table 4) and the potency tests (Table 2). One may speculate that the amount of antigen contained in the vaccine was not sufficient or that these subtypes are poor antigens. Graves (13) indicated that some disease response is to be expected at challenge with a mean  $PD_{50}$  below 2. Little difference was seen in the response of the aluminum-gel and the oil-adjuvanted vaccines in cattle with FMDV  $C_3$  after vaccination or revaccination. Results were more promising with the oil-adjuvanted vaccine in sheep. The aluminum-gel vaccine adequately protected sheep against exposure with subtype  $O_1$ , but antibody levels against this subtype were considerably lower than those obtained with the oil-adjuvanted vaccine. Results with these subtypes were poor in pigs with both aluminum-gel vaccine and oil-adjuvanted vaccine, but the response after revaccination was slightly better with the oil-adjuvanted vaccine than with the aluminum-gel vaccine. The clinical signs in pigs vaccinated with the oil-adjuvanted vaccine were less severe than those of the control pigs, and the oil-adjuvanted vaccines offered some degree of protection.

The stability of the vaccine was quite satisfactory. After the PIADC potency test and the revaccination trial at PAFMDC, the vaccine was returned to PIADC and tested

by complement fixation and animal inoculation. Results were not different from those originally obtained in the initial testing at PIADC. However, improvement of the vaccine formulation would be required before field application could be considered. Such improvement could include an increase in the amount and stability of the antigens and an increased shelf life beyond 6 months for the consistency of the emulsion.

## ABSTRACT

Antibody response of cattle against foot-and-mouth disease virus  $C_3$  of both aluminum-gel type vaccine and oil-adjuvanted vaccine was quite poor and of short duration. Revaccination with both types of vaccine considerably increased the antibody response.

In sheep, antibody levels against  $O_1$  after inoculation with the aluminum-gel adjuvanted vaccine reached a peak at 1 month. The oil vaccine induced excellent protection for as long as 9 months after vaccination against  $O_1$ .

Both vaccines produced only a minimal antibody response after vaccination in pigs, but with the oil vaccine, clinical signs were less severe than in control pigs.

The results with the oil vaccines were less favorable than expected. The amount of antigen contained in the vaccine may not have been sufficient or the subtypes used possibly were poor antigens.

## REFERENCES

1. VAN BEKKUM, J.G.; FRENKEL, S.; NATHANS, I. De enting van varkens tegen mond- en klauwzeer. *Tijdschr. v. Diergeneesk.* 25: 1936-1944, 1963.

2. LUCAM, F.; FEDIDA, M.; DANNACHER, G.; PERRAUD, J. What may be expected concerning foot-and-mouth disease vaccination in pigs. Report of the Meeting of the Research Group of the Standing Technical Committee, European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, held in Pirbright, England, September 14-16, 187-201, 1966.
3. MCKERCHER, P.D.; GIORDANO, A.R. Foot-and-mouth disease in swine. I. The immune response of swine to chemically-treated and non-treated foot-and-mouth disease virus. Report of the Meeting of the Research Group of the Standing Technical Committee, European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, held in Pirbright, England, September 14-16, 170-186, 1966.
4. MCKERCHER, P.D.; GIORDANO, A.R. Immune response of steers inoculated with chemically-treated foot-and-mouth disease virus preparations previously studied in swine. *Arch. ges. Virusforsch.* 20: 190-197, 1967.
5. GRAVES, J.H.; MCKERCHER, P.D.; FARRIS, Jr., H.E.; COWAN, K.M. Early response of cattle and swine to inactivated foot-and-mouth disease vaccine. *Res. vet. Sci.* 9: 35-40, 1968.
6. ABREU, MARTINS I. Vacunas antiaftosas hidróxido-saponinadas inactivadas por el formol. *Bltm Centro Panamericano de Fiebre Aftosa* 1: 1-19, 1971.
7. CUNHA, R.G.; BAPTISTA, Jr. J.A.; SERRÃO, U.M.; TORTURELLA, I. El uso de los ratones lactantes en la evaluación de los anticuerpos contra el virus de la fiebre aftosa y su significación inmunológica. *Gac vet.* 19: 243-267, 1957.
8. CUNLIFFE, H.R.; GRAVES, J.H. Formalin-treated foot-and-mouth disease virus: comparison of two adjuvants in cattle. *Can. J. comp. Med. vet. Sci.* 27: 193-196, 1963.
9. ALONSO FERNANDEZ, A.; FERNANDES, M.V. Experimental inoculation of sheep with foot-and-mouth disease virus. *Bull. Off. int. Epiz.* 73: 507-520, 1970.
10. MCKERCHER, P.D.; GAILIUNAS, P. Response of swine to inactivated foot-and-mouth disease vaccine. Duration of immunity and local tissue reaction. *Arch. ges. Virusforsch.* 28: 165-176, 1969.
11. MORGAN, D.O.; MCKERCHER, P.D.; BACHRACH, H.L. Quantitation of the antigenicity and immunogenicity of purified foot-and-mouth disease virus vaccine for swine and steers. *Appl. Microbiol.* 70: 770-774, 1970.
12. RIVENSON, S.; IBARRA, O.; GAGGINO, O.P.; LAPORTE, O.; GARCIA OLANO, H.; PIZZI, J.C.; MARANGUNICH, L. Estudio comparativo con un nuevo tipo de vacuna antiaftosa oleosa en bovinos. *Revta Invest. Agrop.*, INTA, Buenos Aires, Rep. Argentina. Serie 4 Patología Animal, IX (2), 1972.
13. GRAVES, J.H. Immune response of cattle to different serotype antigens in monovalent foot-and-mouth disease vaccines. *J. Immun.* 102: 58-62, 1969.

## VACUNAS CONTRA LA FIEBRE AFTOSA. II. ESTUDIOS SOBRE LA DURACION DE LA INMUNIDAD EN BOVINOS Y PORCINOS

por el

Centro de Enfermedades de Animales de Plum Island\*

y el

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa\*\*

### INTRODUCCION

En un trabajo publicado en este mismo número (1) se informa sobre un estudio realizado en colaboración entre el Centro de Enfermedades de Animales de Plum Island (PIADC) y el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (CPFA). En ese estudio la respuesta inmunitaria a la vacunación y revacunación de bovinos, ovinos y porcinos inoculados con vacuna emulsificada con el adyuvante incompleto de Freund se comparó con la obtenida en animales inoculados con la vacuna convencional, inactivada con formaldehído y adicionada de hidróxido de aluminio-saponina.

En el presente estudio sólo se utilizaron vacunas de adyuvante oleoso. El objetivo fue comparar la respuesta de cerdos a vacunas preparadas por cada Centro a partir de una misma fuente de antígeno. Otra vacuna

emulsificada con adyuvante incompleto de Freund, preparada por PIADC se empleó para estudiar la duración de inmunidad de bovinos vacunados y revacunados.

### MATERIALES Y METODOS

#### 1. Virus

Fueron utilizados los mismos subtipos O<sub>1</sub>, A<sub>24</sub> y C<sub>3</sub> de origen sudamericano, descritos en la publicación mencionada (1).

#### 2. Vacunas

Cada Centro elaboró sus vacunas con las mismas semillas de virus, según el protocolo de producción descrito (1). El CPFA preparó una vacuna con antígenos más concentrados, para uso en cerdos; para tal efecto, una parte de los antígenos inactivados se concentró por precipitación con sulfato de amonio, se dializó contra 100 volú-

\* P.D. McKercher; J.H. Graves; H. Cunliffe; J.J. Callis. ARS, USDA, Plum Island Animal Disease Center, P.O. Box 848, Greenport, New York 11944, U.S.A.

\*\* P. Augé de Mello; I. Gomes; A. Alonso Fernández; M.V. Fernandes. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, O.P.S. - Caixa Postal 589, ZC-00, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

"La mención de una marca registrada o de propiedad de un producto no constituye una certificación de garantía de ese producto por parte del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América ni implica su aprobación ni la exclusión de otros productos utilizables."

menes de 0,2 M NaCl, 0,05 M de buffer fosfato, a pH 7,4, agregándole después adyuvante oleoso. La vacuna elaborada en el PIADC se sometió a pruebas de inocuidad según se informó (2). Los títulos de infectiosidad y de fijación de complemento de los antígenos se ven en la Tabla 1.

### 3. Vacunación

Se vacunaron bovinos mestizos de cebú, de 1 a 3 años de edad, con un peso aproximado de 200 kg, con 6 ml de la vacuna del PIADC por vía subcutánea en la tabla del cuello. Cerdos Landrace, de 3 a 5 meses de edad, y 30 a 40 kg de peso, fueron vacunados con una dosis subcutánea de 6 ml, en la base de la oreja. La vacuna concentrada del CPFA se aplicó en el mismo lugar en una dosis de 2 ml.

### 4. Examen de anticuerpos

Mensualmente se obtuvieron muestras de sangre de los cerdos y de los bovinos para la investigación de anticuerpos séricos por la prueba de protección en ratones lactantes descrita (3). En los animales del PIADC se determinaron los valores de  $DP_{50}$  en ratones lactantes, según se informó (4), utilizando los tres tipos de virus.

### 5. Exposición al virus

A los cerdos se les inculó  $10^{4,6} DL_{50}$  ratón de uno de los tres subtipos, por vía intraplantar, en una pata. A los bovinos se les inculó  $10^4 DL_{50}$  ratón del subtipo  $O_1$  por vía intradermolingual.

## RESULTADOS

Las vacunas resultaron inócuas en pruebas realizadas en ratones lactantes o en bovinos. Los resultados de las pruebas de potencia de la vacuna del PIADC, realizadas en ese Centro, demostraron que 5, 4 y 5 de cada grupo de 6 novillos, estaban protegidos para los tipos O, A y C, respectivamente. Una prueba de potencia realizada en el PIADC con cerdos, 28 días después de la vacunación, reveló que de un grupo de 6

cerdos, los 6 estaban protegidos frente al virus de tipo O; cerdos vacunados con 6 ml de vacuna trivalente no fueron expuestos a los virus tipos A y C. Estos resultados y la media de los valores  $DP_{50}$  de estos animales, que se observan en la Tabla 2, indican que las vacunas eran de calidad aceptable.

### Cerdos

En varios cerdos inoculados con las vacunas oleosas se observaron severas reacciones locales en el sitio de la inoculación a partir del 6º día, aproximadamente, de la vacunación. Las lesiones tenían de 5 a 15 cm de diámetro, y desarrollaron abscesos estériles o extensas ulceraciones. A este respecto, no se apreció diferencia entre las vacunas comunes y las concentradas.

La vacuna del PIADC indujo una buena inmunidad contra el subtipo  $A_{24}$ , reflejada en un alto grado de resistencia a la exposición al virus, uno y tres meses después de la vacunación (Tabla 3 y Fig. 1). A los 6 meses el nivel medio de los anticuerpos contra esta cepa de virus se mantenía alto, pero, sólo 4 de 14 cerdos resistieron a la inoculación del virus. Sin embargo, las lesiones de los animales vacunados eran mucho menos graves que las de los controles no vacunados, expuestos al mismo tiempo. Los resultados con los subtipos  $O_1$  y  $C_3$  fueron menos favorables, pero, asimismo, hubo una diferencia apreciable en la reacción clínica entre los cerdos vacunados y los controles sin vacunar.

El estudio de la respuesta inmunitaria a la vacuna del CPFA, y a la vacuna concentrada del CPFA, se dio por terminado tres meses después de la vacunación, debido al resultado más bien mediocre de los niveles de anticuerpos y a la descarga de virus (Tabla 3 y Fig. 1). Nuevamente el subtipo  $A_{24}$  produjo un estímulo mejor que los subtipos  $O_1$  y  $C_3$ .

### Bovinos

En el sitio de inoculación de la vacuna sólo se observó una reacción tisular míni-

ma. En la Tabla 3 y en la Fig. 2 se presentan los resultados de la vacunación y revacunación de los bovinos con la vacuna del PIADC. Un mes después de la vacunación los niveles de anticuerpos estaban en un rango de protección (ISP  $\geq 2$ ) y 13 de 16

bovinos no mostraron signos clínicos tras la descarga de virus del subtipo O<sub>1</sub>. Los niveles de anticuerpos se mantuvieron estables, y el grado de protección era similar, a los 4 y a los 6 meses de la vacunación.

TABLA 1 - Pruebas de infecciosidad y de fijación de complemento de los virus usados para la producción de vacunas experimentales adicionadas de adyuvante incompleto de Freund

Subtipo	Centro de Enfermedades de Animales de Plum Island		Centro Panamericano de Fiebre Aftosa		
			Vacuna normal		Vacuna concentrada
	UFP <sup>a)</sup>	FC	UFP <sup>a)</sup>	FC	FC
O <sub>1</sub>	N.D. <sup>b)</sup>	1/54	7,4	1/32	1/80
A <sub>24</sub>	N.D.	1/50	7,0	1/11	1/100
C <sub>3</sub>	N.D.	1/56	6,9	1/13	1/130

a) UFP = unidades formadoras de placas /ml.

b) N.D. = datos no disponibles.

TABLA 2 - Promedios de los puntos finales de las DP<sub>50</sub><sup>a)</sup> de seis animales, por especies, en pruebas de potencia en el Centro de Enfermedades de Animales de Plum Island

Tipo de virus	DPV <sup>b)</sup>	Bovinos	Cerdos
O <sub>1</sub>	28	1,87	1,33
A <sub>24</sub>	28	2,87	2,87
C <sub>3</sub>	28	2,34	2,13

a) DP<sub>50</sub> = log<sub>10</sub> de la recíproca de la dilución de suero que protege al 50% de los ratones contra 100 DL<sub>50</sub> de virus.

b) DPV = días postvacunación.

TABLA 3 - Animales protegidos en descargas de virus para pruebas de inmunidad, vacunados con vacunas de adyuvante oleoso

Especies	Meses		Virus de descarga	Centro de Enfermedades de Animales de Plum Island vacuna <sup>a)</sup>	Centro Panamericano de Fiebre Aftosa <sup>a)</sup>	
	1 <sup>a</sup> vacunación	Después de la revacunación			Vacuna normal	Vacuna concentrada
Cerdos	1		A <sub>24</sub>	10/12	7/12	3/8
	1		O <sub>1</sub>	4/12	3/12	0/8
	3		O <sub>1</sub>	1/12	0/11	-
	3		C <sub>3</sub>	2/12	0/11	0/7
	3,5		A <sub>24</sub>	7/8	-	0/8
	6		A <sub>24</sub>	4/14	-	-
Bovinos	1		O <sub>1</sub>	13/16	-	-
	4		O <sub>1</sub>	12/16	-	-
	6		O <sub>1</sub>	13/16	-	-
	12	6	O <sub>1</sub>	15/16	-	-
	18	12	O <sub>1</sub>	9/14	-	-

a) número de animales protegidos/número de animales probados.

- no realizado.

La revacunación produjo una marcada elevación de los niveles de anticuerpos, estableciéndose altas mesetas. Sólo alrededor de 6 meses después de la revacunación pudo observarse un ligero descenso del nivel de anticuerpos, pero, en ese momento estaban protegidos más del 90% de los bovinos (5). Al final del período de observación (18

meses) el número de bovinos que no desarrollaron enfermedad clínica tras la exposición al virus era menor que el indicado por el promedio de los resultados de la prueba de seroprotección en ratones. Sin embargo, individualmente, había una buena correlación entre los niveles de anticuerpos y la protección de los animales.

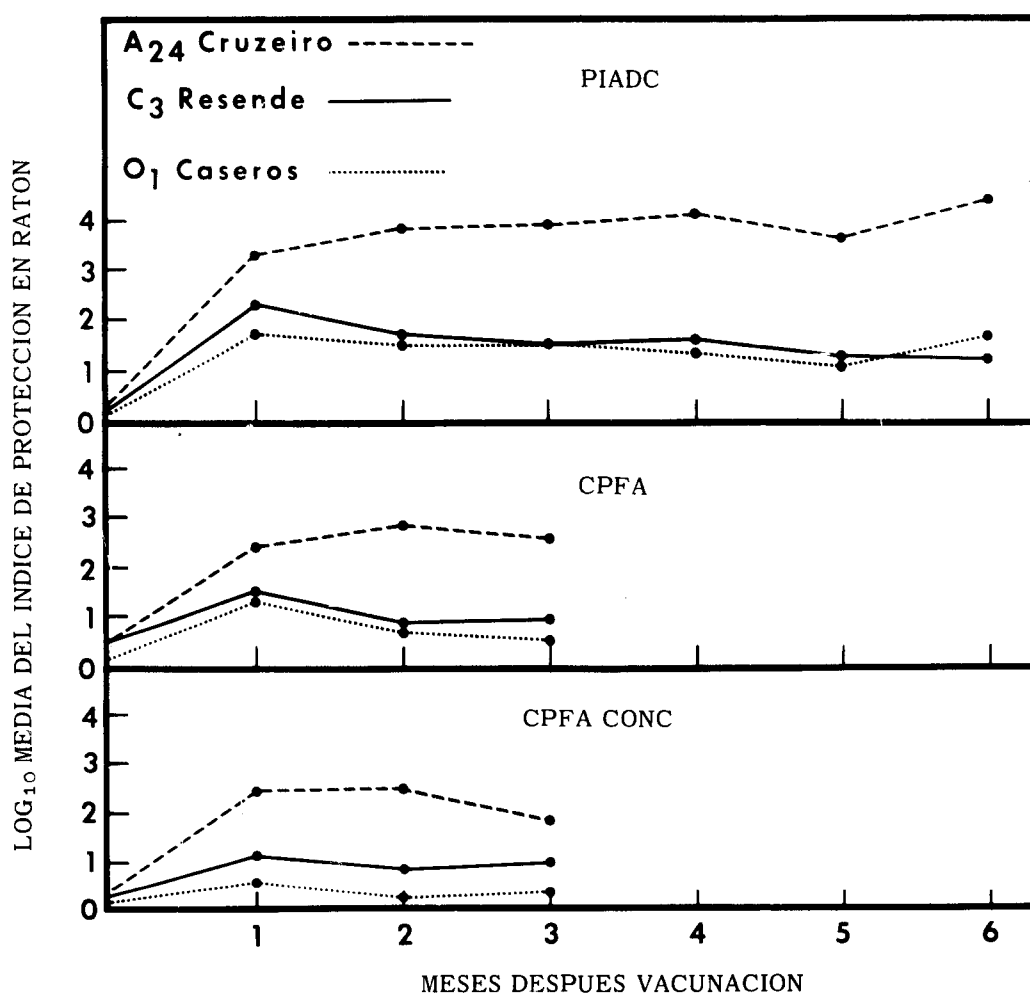


FIGURA 1 - Promedio de los índices de protección en cerdos vacunados con vacuna experimental trivalente contra la fiebre aftosa adicionada de adyuvante oleoso, preparada en el PIADC y en el CPFA.

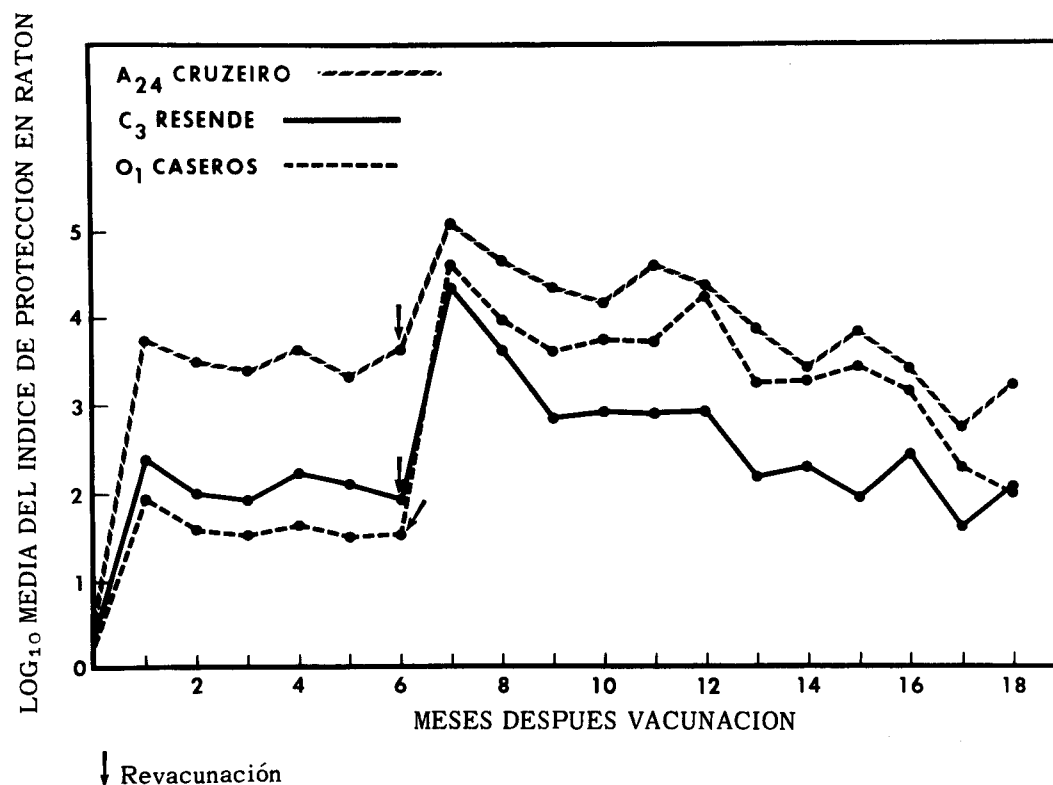


FIGURA 2 - Promedio de los índices de protección en bovinos vacunados con vacuna experimental trivalente con adyuvante oleoso y revacunados con una vacuna similar 6 meses después de la primera vacunación.

#### DISCUSION

Los títulos infecciosos del antígeno empleado para la elaboración de la presente vacuna eran semejantes a los del primer estudio (1), pero, los títulos superiores de FC indicaban una mayor masa antigénica. Los resultados de las pruebas de potencia también sugerían que estas vacunas deberían dar una mejor protección. En el CPFA se efectuó un estudio de respuesta en cerdos

según dosis con la vacuna de adyuvante oleoso, preparado en el PIADC, examinándose los sueros, para anticuerpos, en el CPFA. El análisis de los índices de seroprotección reveló una diferencia notable de anticuerpos entre los tres tipos. La respuesta al antígeno tipo A<sub>24</sub> fue significativamente mayor que la respuesta al antígeno O<sub>1</sub>. Esto concuerda con los resultados obtenidos en las pruebas de potencia y con los que se presentan en la Tabla 3 y en las Figuras 1 y 2.

En los cerdos, la reacción tisular en el sitio de inoculación, fue un problema mayor que el esperado (6). Es posible que la piel blanca, relativamente delgada, de los cerdos Landrace y el volumen de la dosis de vacuna usada en estos experimentos, favoreciese el desarrollo de las reacciones inflamatorias. Será necesario considerar, en futuras experiencias, otros sitios de inoculación y una reducción en la dosis para resolver el problema de estas reacciones locales antes de poder recomendar la aplicación de este tipo de vacunas a los cerdos, en el campo. Sin embargo, parecería que hubiera sido posible aplicar una dosis menor, por que en los estudios sobre dosis hubo un aumento significativo de respuesta cuando la dosis de vacuna subió de 0,5 ml a 2,0 ml, pero la respuesta no aumentó significativamente cuando la dosis se elevó de 2,0 ml a 8,0 ml (PIADC). Por otro lado, experiencias recientes con una dosis total de 0,25 ml de antígeno purificado, según se discutió (7), parecen ayudar a resolver el problema de las reacciones locales. No fue posible establecer una correlación entre la presencia, ausencia o extensión de las reacciones locales y la respuesta inmunitaria, pero, en el CPFA se ha observado que los cobayos que desarrollan abscesos en el punto de inoculación de vacunas inactivadas adicionadas de saponina tienen una respuesta inmunitaria más pobre que los inoculados con la misma vacuna pero que no presentan esas reacciones (A.A. Fernández, comunicación personal). En los bovinos no hubo complicaciones después de la vacunación.

La respuesta inmunitaria y la protección de los cerdos fueron considerablemente mejores con la vacuna oleosa del PIADC en comparación con los resultados de los estudios cooperativos anteriores de ambos Centros (1). Las diferencias observadas entre las vacunas del PIADC y del CPFA se relacionan, posiblemente, con diferencias en las técnicas de emulsión o en la

cantidad de la masa antigénica, o en ambas. Sin embargo, la concentración del antígeno en la vacuna del CPFA no aumentó su potencia para los cerdos, lo que parece indicar que intervienen otros factores en el proceso de formulación, como la degradación del antígeno. Es interesante destacar, además, que las pruebas realizadas en cobayos en el PIADC demostraron que la vacuna del PIADC se mantuvo uniformemente estable durante los 8 meses de la prueba.

Los resultados de la vacunación de bovinos indican que con vacuna de adyuvante oleoso, inactivadas por AEI, se puede esperar una protección adecuada por un período de por lo menos 6 meses. Parece que es posible inducir una sólida inmunidad de la población, particularmente, cuando se vacuna en forma sistemática dos veces al año. La ampliación del intervalo, de cuatro para seis meses entre las vacunaciones, posiblemente reduciría en 1/3 el costo de las campañas de vacunación que se efectúan actualmente en América del Sur y por lo tanto, una experiencia de campo en gran escala con vacunas de adyuvante oleoso estaría bien justificada.

#### RESUMEN

En los cerdos, la vacuna produce una buena inmunidad contra el virus aftoso de tipo A<sub>24</sub>, según se deduce de la resistencia a la exposición al virus efectuada al mes y a los tres meses de la vacunación. A los 6 meses, la media de los niveles de anticuerpos contra esta cepa se mantuvo alta pero sólo 4 de los 14 cerdos resistieron a la exposición. No obstante, las lesiones que presentaron los cerdos vacunados fueron mucho menos severas que las que mostraron los cerdos controles expuestos al virus en el mismo tiempo. La respuesta para la cepa A<sub>24</sub> fue mejor que para el O<sub>1</sub> y el C<sub>3</sub>.



Los resultados de la vacunación en bovinos mostraron que con las vacunas inactivadas con AEI y adicionadas de adyuvante oleoso se puede esperar una adecuada protección durante un período no menor de 6 meses. Un mes después de la vacunación, 13 de 16 bovinos no presentaron signos clínicos de la enfermedad después de haber sido expuestos al virus O<sub>1</sub>. Los niveles de anticuerpos permanecieron estables y la protección a los 4 y 6 meses de la vacuna-

ción fue semejante. La revacunación estimuló los niveles de anticuerpos y los bovinos protegidos llegaron al 90% a los 6 meses. La reacción de los tejidos en el sitio de inoculación de la vacuna fue mínima.

Sin embargo, en varios cerdos las vacunas oleosas causaron severas reacciones locales en el sitio de la inoculación que comenzaron a hacerse evidentes alrededor del 6º día después de la vacunación.

#### REFERENCIAS

1. PLUM ISLAND ANIMAL DISEASE CENTER; PAN AMERICAN FOOT-AND-MOUTH DISEASE CENTER.  
Foot-and-mouth-disease vaccines. I. Comparison of vaccines prepared from virus inactivated with formalin and adsorbed on aluminum hydroxide gel with saponin and virus inactivated with acetyleneimine and emulsified with incomplete Freund's adjuvant. *Bltm Centro Panamericano de Fiebre Aftosa*, esta edición.
2. MCKERCHER, P.D.; GIORDANO, A.R.  
Foot-and-mouth disease in swine. I. The immune response of swine to chemically-treated and non-treated foot-and-mouth disease virus. Report of the Meeting of the Research Group of the Standing Technical Committee, European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, held in Pirbright, England, September 14-16, 1970-186, 1966.
3. CUNHA, R.G.; BAPTISTA, Jr., J.A.; SERRÃO, U.M.; TORTURELLA, I.  
El uso de los ratones lactantes en la evaluación de los anticuerpos contra el virus de la fiebre aftosa y su significación inmunológica. *Gac. vet.* 19: 243-267, 1957.
4. CUNLIFFE, H.R.; GRAVES, J.H.  
Formalin-treated foot-and-mouth disease virus: comparison of two adjuvants in cattle. *Can. J. comp. Med. vet. Sci.* 27: 193-196, 1963.
5. CALLIS, J.J.; MCKERCHER, P.D.; GRAVES, J.H.; FERNANDES, M.V.  
Foot-and-mouth disease virus-immunization. Proceedings XIX Congreso Mundial de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Vol. 3, 1971.
6. MCKERCHER, P.D.; GAILIUNAS, P.  
Response of swine to inactivated foot-and-mouth disease vaccine. Duration of immunity and local tissue reaction. *Arch. ges. Virusforsch.* 28: (2): 165-176, 1969.
7. BACHRACH, H.L.; MCKERCHER, P.D.  
Immunology of foot-and-mouth disease in swine: Experimental inactivated virus vaccines. *JAVMA* 160: 521-526, 1972.

## FOOT-AND-MOUTH DISEASE VACCINES. II. STUDIES ON THE DURATION OF IMMUNITY IN CATTLE AND PIGS

by

The Plum Island Animal Disease Center\*

and

Pan American Foot-and-Mouth Disease Center\*\*

### INTRODUCTION

In a companion paper (1), a cooperative study was reported between the Plum Island Animal Disease Center (PIADC) and the Pan American Foot-and-Mouth Disease Center (PAFMDC). In that study, the immune response after vaccination and revaccination of cattle, sheep and pigs to a foot-and-mouth disease (FMD) vaccine emulsified with incomplete Freund's adjuvant was compared with the response to a commonly used formaldehyde-inactivated aluminum-hydroxide-saponin vaccine.

In the present study, only oil-adjuvanted vaccines were tested. The objective was to compare the response of pigs to vaccines prepared by each of the Centers from an identical source of antigen. A vaccine emulsified with incomplete Freund's adjuvant, prepared at the PIADC, was also used to study the duration of immunity of vaccinated and revaccinated cattle.

### MATERIALS AND METHODS

#### 1. *Virus*

The virus strains used were subtypes O<sub>1</sub>, A<sub>24</sub> and C<sub>3</sub> of South American origin and were the same as those described in the companion paper (1).

#### 2. *Vaccines*

The vaccines were prepared at each Center from the same seed viruses according to the production protocol described (1). A vaccine prepared by the PAFMDC for use in pigs contained more concentrated antigens. For this vaccine, a portion of the inactivated antigens was concentrated by precipitation with ammonium sulfate, dialyzed against 100 volumes of 0.2 M NaCl, 0.05 M phosphate buffer, pH 7.4, and then adjuvanted with oil. The vaccine prepared at the PIADC was tested for innocuity and safety as indicated (2). The infectivity and

---

\* P.D. McKercher, J.H. Graves, H. Cunliffe and J.J. Callis. ARS, USDA, Plum Island Animal Disease Center, P.O. Box 848, Greenport, New York 11944, U.S.A.

\*\* P. Augé de Mello, I. Gomes, A. Alonso Fernández and M.V. Fernandes. Pan American Foot-and-mouth Disease Center, PAHO - Caixa Postal 589, ZC-00, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

"Mention of a trademark or proprietary product does not constitute a guarantee or warranty of the product by the U.S. Department of Agriculture, and does not imply its approval to the exclusion of other products that may also be suitable."

complement-fixation titers of the antigens are given in Table 1.

### 3. Vaccination

Cross-bred Zebu cattle, 1 to 3 years of age and weighing approximately 200 kg, were vaccinated subcutaneously in the neck with a 6-ml dose of PIADC vaccine. Land-race pigs, 3 to 5 months old and weighing 30 to 40 kg, were vaccinated subcutaneously with a 6-ml dose at the base of the ear. The PAFMDC concentrated vaccine was used in a 2-ml dose and inoculated in the same area.

### 4. Antibody assay

Blood samples were collected from the pigs and cattle at monthly intervals, and the antibody content of the sera was assayed by the mouse protection test as described (3). The  $PD_{50}$  values of the sera from the animals at PIADC were obtained in suckling mice as described (4) with the 3 virus types.

### 5. Virus exposure

Pigs were exposed to FMD virus by intraplantar inoculation of one foot with  $10^{4.6}$  mouse  $LD_{50}$  units of one of the 3 subtypes. Cattle were inoculated intradermally with  $10^4$  mouse  $LD_{50}$  units of subtype  $O_1$ .

## RESULTS

The vaccines proved to be innocuous when tested in suckling mice or cattle. The results of the potency tests at the PIADC with the vaccine prepared at that location showed that 5, 4 and 5 out of 6 steers were protected for types O, A and C, respectively. In a potency test in pigs at 28 days after vaccination at the PIADC, 6 out of 6 were protected for type O; pigs vaccinated with a 6-ml dose of trivalent vaccine were not exposed to types A or C. These results and the mean  $PD_{50}$  values of these animals

as summarized in Table 2 indicate that the potency of the vaccines was acceptable.

### Pigs

Local reactions were severe with oil vaccines in several of the pigs at the site of inoculation, starting approximately the 6th day after vaccination. These lesions ranged from 5 to 15 cm in diameter and developed into sterile abscesses or extensive ulceration. The concentrated or regular vaccines were not different in this respect.

The PIADC vaccine induced good immunity against subtype  $A_{24}$ ; this good immunity was reflected in the high degree of resistance to virus exposure at 1 and 3 months after vaccination (Table 3 and Fig. 1). At 6 months, the mean antibody level against this virus strain remained at the same high level but only 4 of the 14 pigs resisted virus exposure. However, the lesions of the vaccinated pigs were much less severe than those of the unvaccinated control pigs exposed at the same time. The results with subtypes  $O_1$  and  $C_3$  were less favorable than those of subtype  $A_{24}$ ; but, again, the difference in clinical response of the vaccinated and unvaccinated control pigs was appreciable.

The study of immune response to the PAFMDC vaccine and the PAFMDC concentrated vaccine was ended 3 months after vaccination because of the rather disappointing antibody levels and protection against virus exposures (Table 3 and Fig. 1). Again, the response of subtype  $A_{24}$  was better than that of subtypes  $O_1$  and  $C_3$ .

### Cattle

Local tissue reaction to the vaccine was only minimal at the site of inoculation. The results of the vaccination and revaccination of cattle with the PIADC vaccine are shown in Table 3 and Fig. 2. One month after vaccination, levels of antibodies were in the protective range ( $MPI \geq 2$ ), and 13 out of 16 cattle were protected against clinical disease after exposure to subtype  $O_1$ . Antibody

levels remained stable, and protection was similar 4 and 6 months after vaccination. Revaccination increased antibody levels, and high plateaus were established. Approximately 6 months after revaccination, the level of antibodies was declining slowly; but at that time, over 90% of the cattle were protected (5). At the end of the

observation period (18 months), the number of cattle protected against clinical disease after virus exposure was lower than the average mouse protection test results indicated. However, on an individual basis, the mouse protection test results correlated well with the protection of the animal.

TABLE 1 - Infectivity and complement-fixation (CF) tests of FMD virus used to produce experimental vaccines emulsified with incomplete Freund's adjuvant

Subtype	Plum Island Animal Disease Center		Pan American FMD Center		
	PFU <sup>a)</sup>	CF	Regular vaccine		Concentrated vaccine
			PFU <sup>a)</sup>	CF	
O <sub>1</sub>	N.A. <sup>b)</sup>	1/54	7.4	1/32	1/80
A <sub>24</sub>	N.A.	1/50	7.0	1/11	1/100
C <sub>3</sub>	N.A.	1/56	6.9	1/13	1/130

a) PFU = log<sub>10</sub> plaque-forming units/ml.

b) N.A. = data not available.

TABLE 2 - PD<sub>50</sub><sup>a)</sup> value mean endpoints of six animals per species in the potency test at the Plum Island Animal Disease Center

Virus type	DPV <sup>b)</sup>	Cattle	Pigs
O <sub>1</sub>	28	1.87	1.33
A <sub>24</sub>	28	2.87	2.87
C <sub>3</sub>	28	2.34	2.13

a) PD<sub>50</sub> = log<sub>10</sub> of the reciprocal of the serum dilution protecting 50% of mice against 100 LD<sub>50</sub> of virus.

b) DPV = days postvaccination.

TABLE 3 - Animals protected on challenge of immunity after vaccination with oil-adjuvanted vaccine

Species	Months		Challenge virus	Plum Island Animal Disease Center vaccine <sup>a)</sup>	Pan American FMD Center <sup>a)</sup>	
	1st vaccination	After revaccination			Regular vaccine	Concentrated vaccine
Pigs	1		A <sub>24</sub>	10/12	7/12	3/8
	1		O <sub>1</sub>	4/12	3/12	0/8
	3		O <sub>1</sub>	1/12	0/11	-
	3		C <sub>3</sub>	2/12	0/11	0/7
	3.5		A <sub>24</sub>	7/8	-	0/8
	6		A <sub>24</sub>	4/14	-	-
Cattle	1		O <sub>1</sub>	13/16	-	-
	4		O <sub>1</sub>	12/16	-	-
	6		O <sub>1</sub>	13/16	-	-
	12	6	O <sub>1</sub>	15/16	-	-
	18	12	O <sub>1</sub>	9/14	-	-

a) number of animals protected/number of animals tested.

- not carried out.

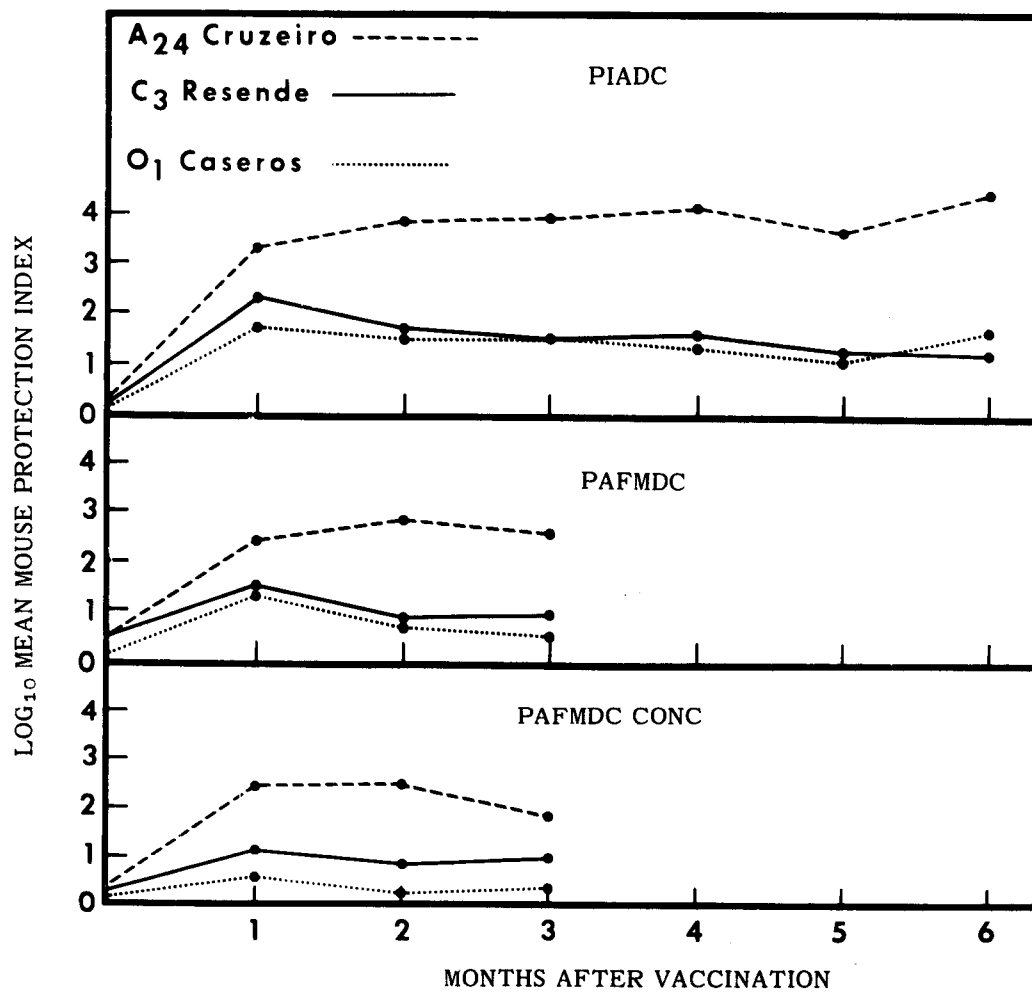


FIGURE 1 - Mean protection indices of pigs vaccinated with trivalent experimental FMD oil-adjuvanted vaccines prepared at PIADC and at the PAFMDC.

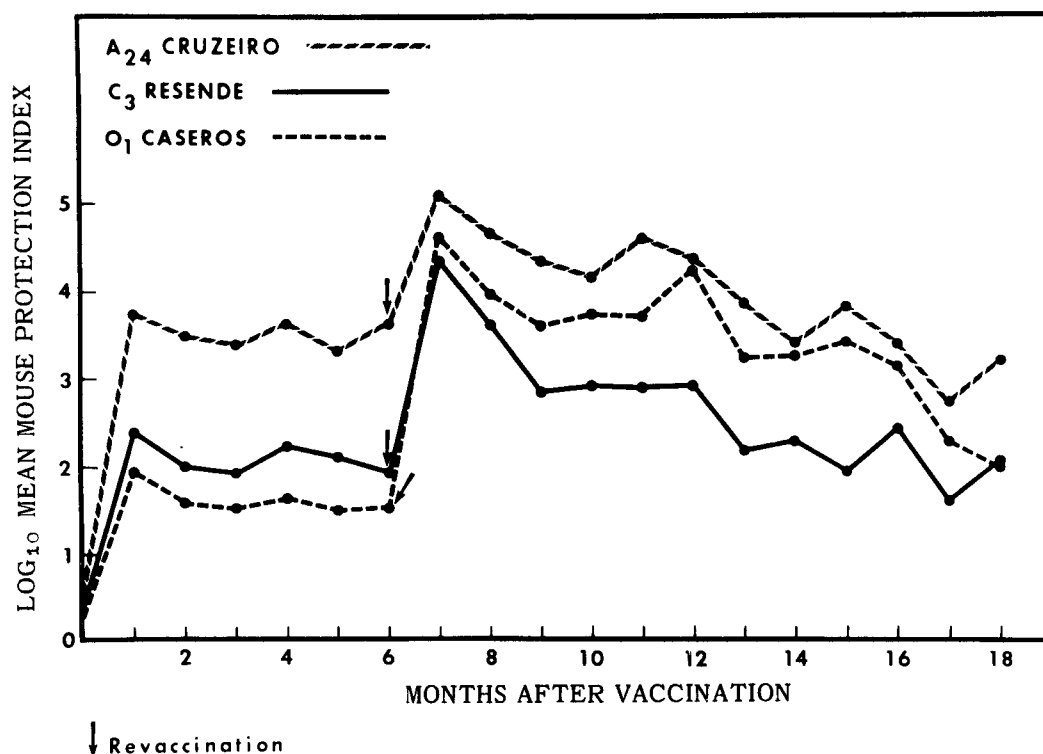


FIGURE 2 - Mean protection indices of cattle vaccinated with a trivalent experimental oil-adjuvanted vaccine and revaccinated with a similar vaccine 6 months after the initial vaccination.

#### DISCUSSION

Infectivity titers of the virus used for the preparation of the present vaccines were similar to those used for the earlier study (1), but the higher complement-fixation titers indicated a larger antigenic mass. The results of the potency tests also indicated that the present vaccines should afford better protection. The dose response was studied at PAFMDC with the PIADC oil-adjuvanted vaccine in pigs, and sera were tested at the PAFMDC for antibodies.

Analysis of the serum protection indices showed a marked difference in antibody among the three types. The antibody response to type A<sub>24</sub> antigen was significantly higher than the response to the type O<sub>1</sub> antigen. This response is in agreement with the results obtained in the potency tests and with those presented in Table 3 and Figs. 1 and 2.

The local tissue reaction at the site of vaccine inoculation in pigs was more of a problem than anticipated (6). Possibly, the

relatively thin white skin of the Landrace pigs and the large dose of vaccines used in this experiment favored the development of the inflammatory reactions. Other inoculation sites and a reduction of the dose in future experiments should be considered in efforts to resolve the problem of these local reactions before field application of this type of vaccine in pigs can be recommended. However, a smaller dose apparently could have been used because in the dose response studies, the response increased significantly when the dose of vaccine was increased from 0.5 ml to 2.0 ml; but the response did not increase significantly above 2.0 ml when the dose was increased to 8.0 ml (PIADC). Also, present experimental methods in which a purified antigen in a total dose volume of 0.25 ml is used as discussed elsewhere (7) would perhaps help to resolve the inflammatory reactions at sites of inoculation. No correlation could be established between the presence, absence or extent of the local reactions and the immune response, but workers at the PAFMDC have observed that the immune response of guinea pigs that developed abscesses at the site of inoculation with inactivated-saponin vaccines was poorer than the response of others without such reactions but inoculated with the same vaccine (A.A. Fernández, personal communication). Cattle had no complications after vaccination.

The immune response and the protection of pigs with the PIADC oil vaccine were considerably better than those reported from earlier cooperative studies between both Centers (1). The differences observed between the PIADC vaccines and those prepared at the PAFMDC possibly relate to differences in emulsification techniques or the amount of antigenic mass, or both. However, concentration of the antigen in the PAFMDC vaccine did not increase its potency in pigs. This finding appears to indi-

cate other factors in the formulation process such as degradation of the antigen. Further, we might note that tests in guinea pigs at the PIADC showed that the PIADC vaccine was uniformly stable during the 8 months of the test period.

The results of the vaccination of cattle indicate that with AEI-inactivated oil-adjuvanted vaccines, adequate protection can be expected for a period of at least 6 months. A solid population immunity apparently can be induced, particularly when vaccine is applied systematically twice a year. An extension of the vaccination interval from 4 to 6 months would possibly reduce by about 1/3 the expense of the vaccination campaigns now in progress in South America; thus, a larger scale field experiment with the oil-adjuvanted vaccines appears to be justified.

#### ABSTRACT

In pigs, the vaccine induced good immunity against foot-and-mouth disease virus A<sub>24</sub>, as reflected in the high degree of resistance to virus exposure at 1 and 3 months after vaccination. At 6 months, the mean antibody level against this virus strain remained high but only 4 of the 14 pigs resisted virus exposure. However, lesions of the vaccinated pigs were much less severe than those of unvaccinated control pigs exposed at the same time. The response of A<sub>24</sub> was better than that of O<sub>1</sub> and C<sub>3</sub>.

The results of cattle vaccination indicate that with AEI-inactivated oil-adjuvanted vaccines adequate protection can be expected for a period of at least 6 months. One month after vaccination, 13 out of 16 cattle were protected against clinical disease after exposure to O<sub>1</sub>. Antibody levels remained stable, and protection was similar 4

and 6 months after vaccination. Revaccination boosted the antibody levels, with 90% of the cattle protected 6 months later. Local tissue reaction to the vaccine was only minimal at the site of inoculation.

However, the oil vaccines caused rather severe local reactions in several of the pigs at the site of inoculation, starting approximately the 6th day after vaccination.

#### REFERENCES

1. PLUM ISLAND ANIMAL DISEASE CENTER; PAN AMERICAN FOOT-AND-MOUTH DISEASE CENTER.  
Foot-and-mouth-disease vaccines. I. Comparison of vaccines prepared from virus inactivated with formalin and adsorbed on aluminum hydroxide gel with saponin and virus inactivated with acetyleneimine and emulsified with incomplete Freund's adjuvant. *Bltm Centro Panamericano de Fiebre Aftosa*, this issue.
2. MCKERCHER, P.D.; GIORDANO, A.R.  
Foot-and-mouth disease in swine. I. The immune response of swine to chemically-treated and non-treated foot-and-mouth disease virus. Report of the Meeting of the Research Group of the Standing Technical Committee, European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, held in Pirbright, England, September 14-16, 1970-186, 1966.
3. CUNHA, R.G.; BAPTISTA, Jr., J.A.; SERRÃO, U.M.; TORTURELLA, I.  
El uso de los ratones lactantes en la evaluación de los anticuerpos contra el virus de la fiebre aftosa y su significación inmunológica. *Gac. vet.* 19: 243-267, 1957.
4. CUNLIFFE, H.R.; GRAVES, J.H.  
Formalin-treated foot-and-mouth disease virus: comparison of two adjuvants in cattle. *Can. J. comp. Med. vet. Sci.* 27: 193-196, 1963.
5. CALLIS, J.J.; MCKERCHER, P.D.; GRAVES, J.H.; FERNANDES, M.V.  
Foot-and-mouth disease virus-immunization. Proceedings XIX Congreso Mundial de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Vol. 3, 1971.
6. MCKERCHER, P.D.; GAILIUNAS, P.  
Response of swine to inactivated foot-and-mouth disease vaccine. Duration of immunity and local tissue reaction. *Arch. ges. Virusforsch.* 28: (2): 165-176, 1969.
7. BACHRACH, H.L.; MCKERCHER, P.D.  
Immunology of foot-and-mouth disease in swine: Experimental inactivated virus vaccines. *JAVMA* 160: 521-526, 1972.



## APLICACION EN EL CAMPO DE VACUNA ANTIAFTOSA OLEOSA E INACTIVADA: VACUNACION Y REVACUNACION DE BOVINOS JOVENES

P. Augé de Mello\*; Vicente Astudillo\*; Ivo Gomes\*;  
J.T. Campos Garcia\*\*

### INTRODUCCION

Estudios realizados en el Centro de Enfermedades de Animales de Plum Island (PIADC) y en el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (CPFA) demostraron, en condiciones de laboratorio, que los bovinos pueden ser protegidos contra la fiebre aftosa (FA) con vacunas preparadas con virus inactivado con N-acetiltileneimina (AEI) y con aceite mineral como adyuvante (12-13). En vista de estos resultados favorables, se programó una investigación de largo plazo para estudiar el uso de estas vacunas en el campo bajo condiciones controladas.

Este trabajo presenta los resultados comparativos de la evaluación de anticuerpos en 2 grupos de bovinos jóvenes vacunados y revacunados, un grupo con vacuna oleosa y el otro con vacuna preparada con el mismo antígeno pero con adyuvante de hidróxido de aluminio. Se presenta también la respuesta de una población de terneros vacunados con vacuna oleosa.

### MATERIALES Y METODOS

#### *Estación experimental*

La estación experimental "Cinco Cruces" del Ministerio de Agricultura del Brasil, ubicada en Bagé, estado de Rio Grande do Sul, fue el lugar elegido para estos estudios. El

establecimiento tiene una extensión de aproximadamente 2.800 hectáreas. La población bovina se compone de un rebaño de carne, cruce de 5/8 Aberdeen-Angus y 3/8 Nelore y de un rebaño de leche de 250 vacas Jersey y Red Dane. La cantidad total de bovinos de carne oscila, en forma estacional, entre 1.600 y 2.500 cabezas. Los terneros nacen en septiembre y octubre y son destetados 6 a 7 meses después. Los animales son pesados con intervalos mensuales hasta que llegan a los 2 años y medio, cuando se los envía al matadero.

Los animales se hallan sometidos a un activo programa de control sanitario que incluye exámenes regulares y tratamiento de ecto y endoparasitosis y, además de las vacunaciones contra la fiebre aftosa, brucelosis, carbunclo bacteriano y carbunclo sintomático.

#### *Esquema de vacunación*

Teniendo en cuenta el manejo del ganado, las condiciones climáticas y las experiencias de laboratorio anteriores (13) se resolvió vacunar a los bovinos con las vacunas en estudio, en intervalos de 6 meses en los períodos abril/mayo y septiembre/octubre de cada año.

Todos los bovinos que estaban en el establecimiento, que no fueron incluidos en este trabajo, continuaron siendo vacunados cada 3 meses con vacunas comerciales inactivadas con AEI y adyuvante de hidróxido de aluminio.

\* Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, Caixa Postal 589, ZC-00, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

\*\* Ministerio de Agricultura de Brasil - EMBRAPA-UEPAE, Cinco Cruces, Bagé, RS, Brasil.

### *Grupos experimentales*

Al comenzar la experiencia un grupo homogéneo de 353 terneros nacidos en 1971 tenían entre 5 y 7 meses de edad. Estos animales fueron mantenidos en las mismas condiciones durante todo el tiempo que duró la experiencia.

#### *1. Comparación de los adyuvantes*

Para comparar la respuesta inmunitaria de la vacuna oleosa y de hidróxido de aluminio, se eligieron al azar 30 terneros machos y 30 hembras que se dividieron, también al azar, en tres grupos. El primer grupo recibió la vacuna oleosa, el segundo la de hidróxido de aluminio y el tercero quedó sin vacunar, sirviendo como testigo. Seis meses más tarde los dos primeros grupos fueron revacunados (Tabla 1). Con intervalos de un mes se tomaron muestras de sangre de todos los terneros para la investigación de anticuerpos circulantes.

#### *2. Inmunidad de la población*

Se estudió la respuesta inmunitaria a la vacuna oleosa en toda la población de 293 terneros restantes. Estos animales fueron vacunados al comienzo de la experiencia y 277 revacunados seis meses después. Cada dos meses se tomaron muestras de sangre al azar de 40-50 terneros, teniendo en cuenta la distribución por sexo.

#### *3. Duración de la inmunidad después de una vacunación*

Un grupo de 16 terneros seleccionados al azar no fue revacunado. Estos animales fueron sangrados mensualmente a partir de los 6 meses hasta los 12 meses de la primovacuna-ción.

### *Antígenos*

Las cepas de virus de la fiebre aftosa utilizadas fueron: O<sub>1</sub> Campos, A<sub>24</sub> Cruzeiro y C<sub>3</sub> Resende, todas de origen sudamericana. Estas cepas fueron adaptadas a cultivos de células BHK-21 (5). Los cultivos celulares en frascos de Roux fueron inoculados con virus

en 50 ml de medio Eagle modificado sin suero. Después de 20 horas de incubación a 37° C se retiraron las suspensiones y fueron mezcladas con 10% (v/v) de trifluortricloroetano. Durante 10 minutos fueron agitadas, clarificadas por centrifugación a 800 x g durante 30 minutos y conservadas a 4° C hasta la inactivación. La infecciosidad fue determinada por titulación en placas y expresada como UFP/dosis de vacuna.

Las pruebas de fijación de complemento realizadas al principio y al final del proceso de inactivación se efectuaron de acuerdo con el método descrito por el CPFA (10), con 4 unidades de complemento, 90 minutos de incubación a 37° C y determinando el 50% de hemólisis en el espectrofotómetro\* (Tabla 1).

#### *Proceso de inactivación*

Cada suspensión de virus fue inactivada con 0,05% de N-acetiletileneimina (AEI) durante 24 horas, en agitación continua en bañomaría a 37° C. Terminada la inactivación el AEI fue neutralizado agregando tiosulfato de sodio en la concentración final de 2% (p/v). Las tasas de inactivación fueron determinadas por el método descrito por Graves (3).

#### *Pruebas de inocuidad*

Después de la inactivación, cada suspensión de antígeno fue inoculada por vía intraperitoneal en dosis de 0,1 ml a 120 ratones lactantes de 7 días de edad. Los ratones inoculados fueron observados durante 10 días. Las suspensiones se consideraron inocuas si ninguno de los ratones moría de infección por fiebre aftosa durante ese período.

#### *Preparación de la vacuna*

Se prepararon dos partidas de vacuna para la vacunación y la revacunación, respectivamente. Se mezclaron los tres antígenos en partes iguales y el total fue dividido en dos partes, agregándose a cada una un adyuvante diferente:

---

\*Coleman Jr. Mod. 6 A.

### 1. Aceite

Una mezcla de monooleato de manide\* y de aceite mineral\*\* en la proporción de 1:10 fue emulsificada con una cantidad igual de suspensión trivalente de virus en un homogeneizador\*\*\* para formar una emulsión agua en aceite.

### 2. Hidróxido de aluminio

Suspensiones de  $\text{Al}(\text{OH})_3$  (concentración al 2% de  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) y de antígeno trivalente se adicionaron en partes iguales mezclando lentamente durante 10 minutos.

#### Pruebas de potencia

La prueba de potencia de las vacunas a los 21 días se hizo usando el índice C en cobayos y el índice K modificado en bovinos. Las vacunas fueron aprobadas con valores para el índice C  $> 2,0$  y para el índice K  $> 1,5$ .

#### Control antigénico

Después de preparada la vacuna y antes de ser usada, se "quebró" la emulsión agregando aceite de soya (4 partes de aceite + 1 de vacuna), mezclando y centrifugando por 30 minutos (J.H. Graves, comunicación personal). La fase acuosa resultante de la centrifugación fue sometida a la prueba de fijación de complemento.

#### Pruebas de anticuerpos

Los niveles de anticuerpos fueron determinados por el índice de seroprotección (1). Se calculó la media de la expectativa porcentual de protección (EPP) de acuerdo con el procedimiento propuesto por Gomes y Astudillo (2). Estos autores consideran protección en bovinos a la ausencia de lesiones en las patas, consecutivas a la inoculación del virus en la lengua.

## RESULTADOS

### Comparación de la vacuna de adyuvante oleoso con la de hidróxido de aluminio

La figura 1 muestra la expectativa porcentual de protección (EPP), para los 3 tipos de virus, en los tres grupos experimentales.

A los 30 días de la vacunación, los animales inoculados con la vacuna con hidróxido de aluminio presentaban una EPP de aproximadamente 60-70%. A los 60 días este valor cayó por debajo de 50% y a los 90 días ya estaba en el mismo nivel de los testigos.

Con la vacuna oleosa, a los 30 días, la EPP fue superior al 70%, continuó subiendo hasta 60 días después de la vacunación cuando alcanzó 80-90%. Estos picos se mantuvieron por casi dos meses y comenzaron a declinar lentamente. A los 6 meses, aún había una EPP considerable (56-54% para  $O_1$  y  $C_3$ , respectivamente y 73 para  $A_{24}$ ).

La revacunación produjo una respuesta anamnésica con ambas vacunas, aun cuando los niveles de protección con la vacuna de hidróxido de aluminio decayeron rápidamente. Con respecto a los virus  $O_1$  y  $C_3$ , a los 4 meses de la revacunación, los niveles de protección de los animales vacunados y de los testigos eran similares. Las EPP alcanzadas por la vacuna oleosa fueron altas y persistieron mucho tiempo. En ambos tipos de vacuna la persistencia de la protección frente al subtipo  $C_3$  fue la menos satisfactoria.

### Inmunidad de la población

La tabla 2 presenta los límites de confianza del 95% para las EPP de los terneros vacunados y revacunados con la vacuna de adyuvante oleoso.

Puede observarse que se ha logrado una excelente inmunidad de masa con vacunaciones aplicadas cada seis meses. Estos resultados confirman también que el subtipo  $A_{24}$  es el mejor antígeno, seguido por el  $O_1$  y que el subtipo  $C_3$  es el antígeno menos eficiente.

\* Arlacel A - ICI America Inc., Atlas Chemicals Division.

\*\* Marcol 52 - Exxon Corporation U.S.A.

\*\*\* Silversen - Machines (Sales) Ltd. London.

*Duración de la inmunidad después de una sola vacunación*

La tabla 3 muestra la duración de la inmunidad en los 16 bovinos vacunados una sola vez con vacuna oleosa. La protección contra

los subtipos O<sub>1</sub> y C<sub>3</sub> alrededor del 70% de los bovinos persistió por lo menos 9 meses después de la vacunación. La respuesta al subtipo A<sub>24</sub> fue superior al 70% de protección a los 12 meses de vacunados.

TABLA 1 - Características de dos partidas de antígenos de virus de la fiebre aftosa usados para la preparación de vacuna para vacunación y revacunación respectivamente

Virus de la fiebre aftosa	Partida					
	I			II		
	UFP	Títulos FC	Tasa de inactivación UFP/min	UFP	Títulos FC	Tasa de inactivación UFP/min
O <sub>1</sub>	7,57	1/25	-0,038*	7,29	1/30	-0,038
A <sub>24</sub>	7,54	1/20	-0,017	7,69	1/15	-0,038
C <sub>3</sub>	7,44	1/25	-0,017	7,92	1/25	-0,027

UFP = log<sub>10</sub> unidades formadoras de placa/dosis de vacuna.

FC = Dilución sérica determinando el 50% de hemólisis antes y después de la inactivación (ver texto).

\* = Disminución de la infecciosidad viral en log<sub>10</sub> UFP por minuto.

TABLA 2 - Inmunidad de la población bovina después de la vacunación y revacunación con vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso.

Edad media de los bovinos (meses)	Meses después de la revacunación		Expectativa porcentual de protección para el virus de la fiebre aftosa		
	1a.	2a.	O <sub>1</sub>	A <sub>24</sub>	C <sub>3</sub>
6	0		22 ± 12	21 ± 12	31 ± 13
8	2		94 ± 7	97 ± 5	85 ± 10
10	4		86 ± 10	90 ± 8	82 ± 11
12	6	0	84 ± 10	94 ± 7	74 ± 12
14	8	2	96 ± 10	100 ± 0	95 ± 6
16	10	4	87 ± 10	97 ± 5	83 ± 11
18	12	6	78 ± 12	91 ± 8	70 ± 13

TABLA 3 - Duración de la inmunidad de bovinos vacunados una sola vez con vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso

Edad media de los bovinos (meses)	Meses después de la revacunación	Expectativa porcentual de protección para el virus de la fiebre aftosa		
		O <sub>1</sub>	A <sub>24</sub>	C <sub>3</sub>
12	6	84	85	72
13	7	68	79	64
14	8	76	89	53
15	9	68	84	70
16	10	58	79	64
17	11	33	77	49
18	12	49	72	41

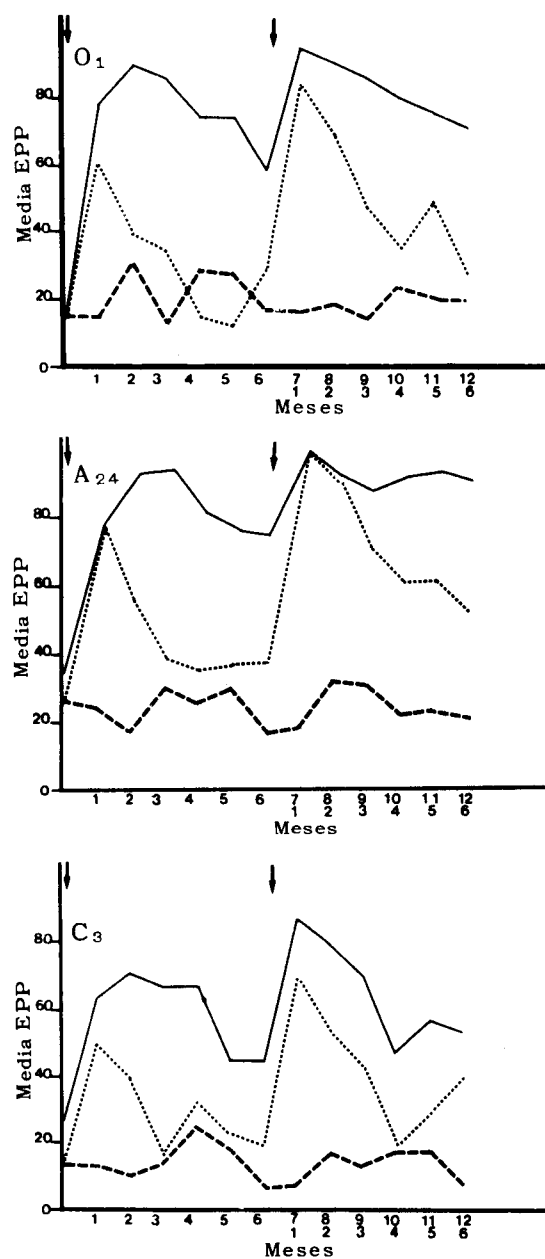


FIGURA 1 - Media de la expectativa porcentual de protección (EPP) de bovinos para los subtipos O<sub>1</sub>, A<sub>24</sub> y C<sub>3</sub> del virus de la fiebre aftosa, después de la vacunación con vacuna de hidróxido de aluminio o vacuna con adyuvante oleoso y los testigos.

— vacuna con adyuvante oleoso.

..... vacuna con hidróxido de aluminio.

----- testigos.

↓ ↓ vacunación/revacunación.

## DISCUSION

Desde hace mucho tiempo se admite que es difícil proteger adecuadamente a los terneros con vacuna inactivada con formalina y adicionada con hidróxido de aluminio, pero que se puede lograr una inmunidad más duradera con repetidas vacunaciones (4, 6, 7, 8, 9). Los resultados de este trabajo confirman esa observación. Los resultados obtenidos con las vacunas de adyuvante oleoso demuestran que estas vacunas en condiciones de campo producen una respuesta inmunitaria de mayor intensidad y de más larga duración que las vacunas con hidróxido de aluminio, preparadas con los mismo antígenos inactivados.

Estas experiencias demuestran las diferencias inmunogénicas entre las cepas de virus empleadas en la preparación de las vacunas. La aptitud de los antígenos para inducir protección en los bovinos varió en gran medida aun cuando los títulos de infecciosidad y de fijación de complemento eran similares. En otros estudios de vacunas con adyuvante oleoso, el subtipo O1 cepa Caseros fue el más pobre de los inmunógenos (12, 13). Por consiguiente, la selección de la cepa más inmunogénica es de capital importancia para la preparación de una vacuna satisfactoria.

Otras investigaciones han mostrado que las vacunas oleosas pueden inducir un alto grado de protección en bovinos adultos (11). Este estudio demuestra que las vacunaciones practicadas con 6 meses de intervalo protegen un alto porcentaje de animales jóvenes. Por tanto, parece factible que puede vacunarse dos veces al año con vacunas de adyuvante oleoso en lugar de las tres vacunaciones anuales que se hacen con las vacunas convencionales. El efecto de refuerzo a los 6 meses

fue satisfactorio aun cuando se requieren nuevos estudios para determinar el intervalo óptimo entre vacunaciones.

La vacunación se llevó a cabo en condiciones de campo bajo control, por lo cual en las próximas etapas, los estudios se extenderán a mayores poblaciones expuestas al riesgo.

## RESUMEN

Se comparó la inmunidad evaluada a través de la prueba de seroprotección, de un grupo de bovinos jóvenes de 5 a 7 meses de edad, mantenidos en condiciones de campo bajo control, vacunados y revacunados con vacuna de adyuvante oleoso con los resultados obtenidos con la vacuna de hidróxido de aluminio. En ambas vacunas se utilizaron los mismos antígenos inactivados con acetiltileneimina (AEI). La expectativa porcentual de protección mostró que la vacuna con adyuvante oleoso, indujo una protección mayor y más duradera que la de hidróxido de aluminio. La revacunación realizada con la vacuna oleosa a los 6 meses produjo una buena respuesta anamnésica con altos niveles de protección y que persistieron por mucho tiempo.

El estudio de un muestreo serológico efectuado cada dos meses en una población de 293 terneros, vacunados cada 6 meses con vacuna oleosa, mostró que, en condiciones de campo, este tipo de vacuna confiere una elevada y duradera protección. Seis meses después de la aplicación de la vacuna oleosa, alrededor del 70% de los animales jóvenes debían estar protegidos. Estos niveles de protección persistieron hasta 9 meses para los tipos O y C y 12 meses para el tipo A.

La elección de la cepa que se utiliza en la preparación de la vacuna mostró ser importante.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los Drs. Luiz Ernani Anadon Cardozo, Cláudio Alano da Silveira e Victor Hugo Conde del Grupo Ejecutivo de Combate a la Fiebre Aftosa (GECOFA) de Rio Grande do Sul, Brasil, por su valiosa asistencia.

## REFERENCIAS

1. CUNHA, R.G.; BAPTISTA JUNIOR, J.A.; SERRÃO, U.; TORTURELLA, I.  
El uso de los ratones lactantes en la evaluación de los anticuerpos contra el virus de la fiebre aftosa y su significación inmunológica. *Gac. vet.* 19 (110): 243-267, 1957.
2. GOMES, I.; ASTUDILLO, V.  
Foot-and-mouth disease: Evaluation of mouse protection test results in relation to cattle immunity. *Bltm Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 17-18: 9-16, 1975.
3. GRAVES, J.H.; ARLINGHAUS, R.B.  
Acetyleneimine in the preparation of inactivated foot-and-mouth disease vaccines. *Proc. Seventy-first ann. meet. U.S. livestock sanit. Ass.*: 296-403, 1967.
4. HONIGMAN, M.N.; GOMES, I.; ABREU M., I. de; LOMBARDO, R.A.  
Persistencia en terneros de la inmunidad postvacunal contra el virus aftoso. *Bltm Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 2: 12-20, 1971.
5. MACPHERSON, I.; STOKER, M.  
Polyoma transformation of hamster cell clones: an investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virology* 16 (2): 147-151, 1962.
6. MACKOWIAK, C.; FONTAINE, J.; LANG, R.; CAMAND, R.; PETERMANN, H.G.  
Étude de la durée de l'immunité conférée par le vaccin antiaphteux aux jeunes bovins. Conférence de la Commission Permanente de la Fièvre Aphteuse de l'Office International des Epizooties, X, Paris Rapport n° 44, 1962. *Bull. Off. int. Épizoot.* 57 (5-6): 937-948, 1962.
7. MUNTU, N.; DOHOTARU, V.; BERCAN, A.; MIRCESCU, G.; TOMESCU, A.; STIRBU, C.  
PD<sub>50</sub> quantitative determinations of the booster effect in foot-and-mouth disease vaccination in cattle. European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease. Report of the Research Group of the Standing Technical Committee at the Instituto Zooprofilattico Sperimentale. Brescia, Italy, 24-26 September 1969. FAO. Rome: 135-138, 1970.
8. MUNTU, N.; DOHOTARU, V.; BERCAN, A.; MIRCESCU, G.; STIRBU, C.; TOMESCU, A.  
Duration of foot-and-mouth disease immunity in one year old cattle after the first vaccination with 10 PD<sub>50</sub>. Report of the Meeting of the Research Group of the Standing Technical Committee. Bundesforschungsanstalt für Viruskkrankheiten der Tiere, Tübingen, Federal Republic of Germany: 75-80, 1971.
9. MUNTU, N.; DUMITRESCU, A.; DOHOTARU, V.; NEGRUTIU, T.  
Durée de l'immunité post-vaccinale contre la fièvre aphteuse par rapport à l'âge des animaux, à la dose de vaccin et à la répétition de la vaccination (effet de rappel). *Bull. Off. int. Épizoot.* 77 (5-6): 771-787, 1972.
10. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA  
Manual de procedimientos para el control de las vacunas antiaftosas. *Ser. Man. Téc.* 2, pp. 33, 1974.
11. RIVENSON, S.; IBARRA, O.; GAGGINO, O.P.; LAPORTE, O.; GARCIA OLANO, H.; PIZZI, J.C.; MARAUGUNICH, L.  
Estudio comparativo con un nuevo tipo de vacuna antiaftosa oleosa en bovinos. *Revta Investnes Agropec.* 9 (2): 53-80, 1972.

12. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE AND PAN-AMERICAN HEALTH ORGANIZATION

Foot-and-mouth disease vaccines. I. Comparison of vaccines prepared from virus inactivated with formalin and adsorbed on aluminum hydroxide gel with saponin and virus inactivated with acetyleneimine and emulsified with incomplete Freund's adjuvant. Collaborative research Plum Island Animal Disease Center and Pan-American Foot-and-Mouth Disease Center. *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa 19-20*: 9-16, 1975.

13. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE AND PAN-AMERICAN HEALTH ORGANIZATION

Foot-and-mouth disease vaccines. II. Studies on the duration of immunity in cattle and pigs. Collaborative research Plum Island Animal Disease Center and Pan-American Foot-and-Mouth Disease Center. *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa 19-20*: 24-30, 1975.



## FIELD APPLICATION OF INACTIVATED OIL ADJUVANTED FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS VACCINE: VACCINATION AND REVACCINATION OF YOUNG CATTLE

P. Augé de Mello\*; Vicente Astudillo\*; Ivo Gomes\*;  
J.T. Campos Garcia\*\*

### INTRODUCTION

Studies at the Plum Island Animal Disease Center (PIADC) and the Pan-American Foot-and-Mouth Disease Center (PAFMDC) demonstrated that under laboratory conditions cattle could be adequately protected against foot-and-mouth disease (FMD) with vaccines prepared from FMD virus inactivated with N-acetylmethylamine (AEI) and adjuvanted with mineral oil (12, 13). In view of those favorable results a long-term program was implemented to study the use of such vaccines under controlled field conditions.

This paper describes the results of antibody studies after the vaccination and revaccination of young cattle with oil adjuvanted AEI inactivated FMD virus vaccines. The immune response of a group of these calves was compared with those of another vaccinated with an aluminum-hydroxide vaccine prepared from the same AEI inactivated antigens. The overall immune response of the calf population vaccinated with the experimental oil-vaccine was also assessed.

### MATERIALS AND METHODS

#### *Experimental station*

The site selected for these studies was

the Ministry of Agriculture's "Cinco Cruzes" experimental station in Bagé, in the state of Rio Grande do Sul. The farm comprises nearly 2,800 hectares. The cattle population consists of a closed herd of high quality crossbred beef cattle of 5/8 of Aberdeen-Angus and 3/8 Nelore and of a dairy herd of approximately 250 Jersey and Red Dane cows. The total number of beef cattle fluctuates by season between 1,600 and 2,500 head. Calves are born in September and October, and they are weaned 6-7 months later. The animals are weighed at monthly intervals until they are 2-2.5 years old, at which time the steers are sent to the slaughterhouse.

Besides FMD vaccinations, an active livestock health control program is carried out which includes regular examination and treatment for ecto and endoparasites, and brucellosis, anthrax and blackleg vaccinations.

#### *Vaccination scheme*

In accordance with the herd management practices and weather conditions, it was decided to vaccinate the cattle with the experimental vaccines during the period April/May and September/October of each year. A 6-month vaccination interval was chosen because earlier laboratory experiments (13) had indicated that these vaccines

\* Pan American Foot-and-Mouth Disease Center, Caixa Postal 589, ZC-00, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

\*\* Ministry of Agriculture of Brazil - EMBRAPA-UEPAE, Cinco Cruzes, Bagé, RS, Brazil.

could adequately protect cattle during that period.

All cattle at the station not included in the experiment continued to be vaccinated with commercial AEI inactivated aluminum hydroxide vaccine at 3-month intervals.

#### *Experimental groups*

The 353 calves born in 1971 were 5-7 months old at the start of the experiment. They formed a homogeneous group and were maintained under identical conditions throughout the study.

#### *1. Comparison of adjuvants*

For the comparison of immune response induced by oil vs. aluminum-hydroxide adjuvant vaccines, 30 male and 30 female calves were randomly selected and divided into 3 groups. The first group was vaccinated with the oil vaccine and the second with the aluminum hydroxide. The third was not vaccinated and served as a control. After 6 months the first and second groups were revaccinated with the same type of vaccine (Table 1). All cattle were bled for assay of circulating antibodies before vaccination and at monthly intervals.

#### *2. Population immunity*

In order to study the immune response to the oil vaccine of the population as a whole, the remaining 293 calves were vaccinated at the beginning of the experiment and 277 revaccinated six months later. For the bimonthly serum surveys, a new random selection of 40-50 calves for bleeding was made, taking into account the sex distribution of the calf population.

#### *3. Duration of immunity after one vaccination*

Sixteen calves from the preceding group were randomly selected and identified after the first vaccination and were not revaccinated later. They were bled at monthly

intervals from 6 to 12 months after vaccination.

#### *Antigens*

The following strains of FMD virus of South American origin were used: O<sub>1</sub> Campos, A<sub>24</sub> Cruzeiro and C<sub>3</sub> Resende. These viruses were first adapted to growth in BHK-21 cells (5). Stationary BHK cell cultures grown in Roux flasks were inoculated with virus in 50 ml of Eagle modified medium without serum. After 20 hours incubation at 37° C the virus suspensions were harvested, shaken with 10% (v/v) of trifluor-trichloroethane for 10 minutes, clarified by centrifugation at 800 x g for 30 minutes, and stored at 4° C until inactivation.

Infectivity titers were determined by plaque assay and expressed as PFU/vaccine dose.

Complement fixation was carried out by the regular PAFMDC method (10) with 4 units of complement, 90 minutes of incubation at 37° C and reading 50% hemolysis in a spectrophotometer\*, and assayed at the beginning and at the end of the inactivation process (Table 1).

#### *Inactivation process*

Each virus suspension was inactivated with 0.05% of N-acetylenimine (AEI) for 24 hours under continuous stirring at 37° C in a waterbath. The action of AEI was neutralized by adding sodium thiosulfate in the final concentration of 2% (w/v) after inactivation. Rates of inactivation were determined by the method described by Graves (3).

#### *Inocuity test*

After inactivation, each of the antigen suspensions was inoculated intraperitoneally in 120 unweaned 7-day old mice, 0.1 ml/mouse. They were observed for 10 days, and the suspension was considered to be

---

\* Coleman Jr. Mod. 6A.

inocuous if no mice died of FMD virus infection.

#### *Vaccine formulation*

Two batches of vaccine were prepared for vaccination and revaccination, respectively. Equal portions of each of the three antigens were mixed, and the resulting trivalent product was divided in two portions to which different adjuvants were added:

##### *1. Oil*

A mixture of mannide monooleate\* and mineral oil\*\* in proportion of 1:10 was emulsified with an equal quantity of inactivated trivalent virus suspension by means of a homogenizer\*\*\* to form a water-in-oil emulsion.

##### *2. Aluminum hydroxide*

Equal parts of a colloidal suspension of  $\text{Al}(\text{OH})_3$  (concentration of 2%  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) and of the inactivated trivalent antigen suspensions were slowly added and mixed over a 10-minute period.

#### *Potency test*

The potency of the vaccines 21 days after vaccination was assayed in guinea pigs using the C Index method and in cattle using the modified K Index method (10). The vaccines passed these tests with indices of  $>2.0$  (C) and  $>1.5$  (K).

#### *Antigen control*

After vaccine formulation and prior to use of the vaccine, the emulsion was "broken" by adding soybean oil to the vaccine (4 parts oil + 1 part vaccine), mixing and

centrifugation for 30 min (Dr. J.H. Graves, personal communication). After centrifugation the aqueous phase was assayed by complement fixation (CF) test.

#### *Antibody assay*

Antibody levels were assayed by the mouse protection test (1). Of all groups a mean expected percentage of protection (EPP) was calculated according to the method proposed by Gomes and Astudillo (2). According to their definition, protection in cattle is defined as absence of foot lesions after virus exposure by tongue inoculation.

## RESULTS

#### *Comparison of vaccines adjuvanted with oil or with aluminum hydroxide gel*

The expected percentages of protection (EPP) for the 3 virus types in cattle vaccinated with oil or aluminum-gel vaccine and in the unvaccinated control cattle are presented in Fig. 1.

The aluminum-gel vaccine induced an EPP of approximately 60-70% at 30 days, although these values dropped to less than 50% at 60 days and by 90 days had nearly reached the EPP level of the unvaccinated cattle.

With the oil vaccine the EPP was more than 70% at 30 days, and the protection level continued to rise up to 60 days after vaccination, when an EPP of about 80-90% was reached. These peak levels were maintained for nearly 2 months, after which a slow decline occurred. At 6 months there still was considerable protection ( $O_1$  and  $C_3$  56-54%, respectively, and A 73%).

Revaccination produced a booster effect with both vaccines, although the aluminum-gel vaccine protection levels decreased quite rapidly. With the  $O_1$  and  $C_3$  vaccine the levels of protection were similar to the unvaccinated control 4 months after revac-

\* Arlacel A - ICI America Inc., Atlas Chemicals Division.

\*\* Marcol 52 - Exxon Corporation U.S.A.

\*\*\* Silversen - Machines (Sales) Ltd. London.

cination. The oil vaccine induced high levels of protection at revaccination which lasted much longer. The persistence of protection against subtype C<sub>3</sub> was the least satisfactory of the 3 viruses in both types of vaccine.

#### *Population immunity*

Table 2 lists the 95% confidence limits of the expected percentage of protection from a sample of calves vaccinated and revaccinated with the oil adjuvanted vaccine.

It can be observed that an excellent population immunity was obtained with vac-

cinations every six months. These results also confirm that the A<sub>24</sub> virus is the best antigen, followed by type O<sub>1</sub>, and that type C<sub>3</sub> is the least efficient antigen.

#### *Duration of immunity after one vaccination*

Table 3 lists the duration of immunity in the 16 cattle vaccinated only once with oil adjuvanted vaccine. Protection against subtypes O<sub>1</sub> and C<sub>3</sub> persisted around 70% of the cattle for as long as 9 months after vaccination. The response to subtype A<sub>24</sub> was particularly good with more than 70% protection at 12 months post-vaccination.

TABLE 1 - *Characteristics of two batches of foot-and-mouth disease virus antigens used for the preparation of vaccine for vaccination and revaccination, respectively*

FMD virus	B a t c h					
	I			II		
	Titers		Rate of inactivation PFU/min	Titers		Rate of inactivation PFU/min
	PFU	CF		PFU	CF	
O <sub>1</sub>	7.57	1/25	-0.038*	7.29	1/30	-0.038
A <sub>24</sub>	7.54	1/20	-0.017	7.69	1/15	-0.038
C <sub>3</sub>	7.44	1/25	-0.017	7.92	1/25	-0.027

PFU = log<sub>10</sub> plaque forming units/vaccine dose.

CF = serum dilution giving 50% hemolysis before and after inactivation (see text).

\* = decrease of viral infectivity in log<sub>10</sub> PFU per minute.

TABLE 2 - *Population immunity after vaccination and revaccination of cattle with oil adjuvanted FMD vaccine*

Average age of cattle (months)	Months after vaccination		Expected percentage of protection against FMD virus		
	1st	2nd	O <sub>1</sub>	A <sub>24</sub>	C <sub>24</sub>
6	0		22 ± 12	21 ± 12	31 ± 13
8	2		94 ± 7	97 ± 5	85 ± 10
10	4		86 ± 10	90 ± 8	82 ± 11
12	6	0	84 ± 10	94 ± 7	74 ± 12
14	8	2	96 ± 10	100 ± 0	95 ± 6
16	10	4	87 ± 10	97 ± 5	83 ± 11
18	12	6	78 ± 12	91 ± 8	70 ± 13

TABLE 3 - *Duration of immunity of cattle vaccinated once with oil adjuvanted foot-and-mouth disease vaccine*

Average age of cattle (months)	Months after vaccination	Expected percentage of protection against FMD virus		
		O <sub>1</sub>	A <sub>24</sub>	C <sub>24</sub>
12	6	84	85	72
13	7	68	79	64
14	8	76	89	53
15	9	68	84	70
16	10	58	79	64
17	11	33	77	49
18	12	49	72	41

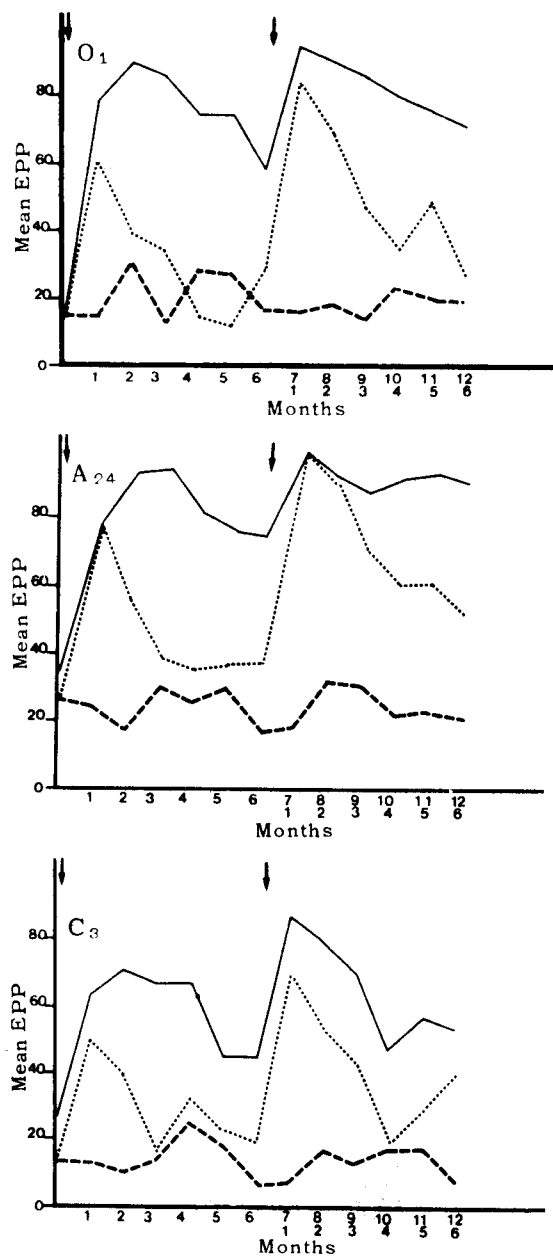


FIGURE 1 - Mean of expected percentages of protection (EPP) of cattle against FMD virus of subtypes O<sub>1</sub>, A<sub>24</sub> and C<sub>3</sub> after vaccination with aluminum-gel vaccine or oil adjuvanted vaccine and of unvaccinated control cattle.

— oil adjuvanted vaccine.

..... aluminum-gel vaccine.

----- unvaccinated controls.

↓ ↓ vaccination/revaccination.

## DISCUSSION

It has long been recognized that young cattle are difficult to protect adequately with the formalin inactivated aluminum-gel vaccine, even though repeated vaccination may lead to a longer lasting immunity (4, 6, 7, 8, 9). Present results support this observation. The results obtained with oil adjuvanted vaccines show that under field conditions these vaccines produce higher, longer lasting immunity in young cattle than aluminum-gel vaccines prepared from identical inactivated antigens.

These experiments show the immunogenic differences among the virus strains used for the preparation of the vaccines. The ability of the antigens to induce protection in the cattle varied greatly even though the viral infectivity and complement fixation (CF) titers were similar. In other studies of oil adjuvanted FMD vaccines, the O<sub>1</sub> strain Caseros was the poorest of the immunogens (12, 13). Thus, selection of the most immunogenic vaccine strain is critical for the preparation of a satisfactory vaccine.

Other studies have shown that oil adjuvanted vaccines can induce a high degree of protection in adult cattle (11). The present population immunity study demonstrated that vaccination at 6-month intervals will also protect a high percentage of young cattle. It thus appears feasible to vaccinate only twice a year with oil adjuvanted vaccines instead of 3 times per year with conventional vaccines. The booster effect at 6 months was satisfactory, although further

studies are needed to establish the optimum vaccination interval.

The vaccinations were carried out under controlled field conditions; and in the next experimental phase the vaccine should be tested in a larger cattle population at risk.

## ABSTRACT

The serum protection test results of a group of 5-7 months old cattle vaccinated and revaccinated under controlled field conditions with oil adjuvanted foot-and-mouth disease vaccine were compared with those of cattle vaccinated with aluminum-hydroxide vaccine. The same acetylenimine (AEI) inactivated antigens were used in both vaccines. The mean expected percentage of protection showed that the oil-adjuvanted vaccine produced a higher and longer lasting protection than the aluminum-gel vaccines. Revaccination with the oil vaccine 6 months later produced a good anamnestic response with high levels of protection which lasted for a long time.

A bimonthly serum survey of the calf population of 293 animals vaccinated with the oil vaccine at 6-month intervals showed that under field conditions this type of vaccine produced high level of long lasting protection. Six months after application of oil vaccines, around 70% of the young cattle were expected to be protected. These levels of protection persisted for up to 9 months for types O and C, and 12 months for type A.

The choice of virus strains to be used for the preparation of the vaccine proved to be important.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Drs. Ernani Anadon Cardozo, Cláudio Alano da Silveira and Victor Hugo Conde of the Foot-and-Mouth Disease Executive Combat Group (GECOFA) of Rio Grande do Sul, Brazil, for their kind assistance.

## REFERENCES

1. CUNHA, R.G.; BAPTISTA JUNIOR, J.A.; SERRÃO, U.; TORTURELLA, I.  
El uso de los ratones lactantes en la evaluación de los anticuerpos contra el virus de la fiebre aftosa y su significación inmunológica. *Gac. vet.* 19 (110): 243-267, 1957.
2. GOMES, I.; ASTUDILLO, V.  
Foot-and-mouth disease: Evaluation of mouse protection test results in relation to cattle immunity. *Bltm Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 17-18: 9-16, 1975.
3. GRAVES, J.H.; ARLINGHAUS, R.B.  
Acetyleneimine in the preparation of inactivated foot-and-mouth disease vaccines. *Proc. Seventy-first ann. meet. U.S. livestock sanit. Ass.*: 296-403, 1967.
4. HONIGMAN, M.N.; GOMES, I.; ABREU M., I. de; LOMBARDO, R.A.  
Persistencia en terneros de la inmunidad postvacunal contra el virus aftoso. *Bltm Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 2: 12-20, 1971.
5. MACPHERSON, I.; STOKER, M.  
Polyoma transformation of hamster cell clones: an investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virology* 16 (2): 147-151, 1962.
6. MACKOWIAK, C.; FONTAINE, J.; LANG, R.; CAMAND, R.; PETERMANN, H.G.  
Étude de la durée de l'immunité conférée par le vaccin antiaphteux aux jeunes bovins. Conférence de la Commission Permanente de la Fièvre Aphteuse de l'Office International des Epizooties, X, Paris Rapport n° 44, 1962. *Bull. Off. int. Épizoot.* 57 (5-6): 937-948, 1962.
7. MUNTIU, N.; DOHOTARU, V.; BERCAN, A.; MIRCESCU, G.; TOMESCU, A.; STIRBU, C.  
PD<sub>50</sub> quantitative determinations of the booster effect in foot-and-mouth disease vaccination in cattle. European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease. Report of the Research Group of the Standing Technical Committee at the Instituto Zooprofilattico Sperimentale. Brescia, Italy, 24-26 September 1969. FAO. Rome: 135-138, 1970.
8. MUNTIU, N.; DOHOTARU, V.; BERCAN, A.; MIRCESCU, G.; STIRBU, C.; TOMESCU, A.  
Duration of foot-and-mouth disease immunity in one year old cattle after the first vaccination with 10 PD<sub>50</sub>. Report of the Meeting of the Research Group of the Standing Technical Committee. Bundesforschungsanstalt für Viruskkrankheiten der Tiere, Tübingen, Federal Republic of Germany: 75-80, 1971.
9. MUNTIU, N.; DUMITRESCU, A.; DOHOTARU, V.; NEGRUTIU, T.  
Durée de l'immunité post-vaccinale contre la fièvre aphteuse par rapport à l'âge des animaux, à la dose de vaccin et à la répétition de la vaccination (effet de rappel). *Bull. Off. int. Épizoot.* 77 (5-6): 771-787, 1972.
10. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA  
Manual de procedimientos para el control de las vacunas antiaftosas. *Ser. Man. Téc.* 2, pp. 33, 1974.
11. RIVENSON, S.; IBARRA, O.; GAGGINO, O.P.; LAPORTE, O.; GARCIA OLANO, H.; PIZZI, J.C.; MARAUGUNICH, L.  
Estudio comparativo con un nuevo tipo de vacuna antiaftosa oleosa en bovinos. *Revta Investnes Agropec.* 9 (2): 53-80, 1972.



12. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE AND PAN-AMERICAN HEALTH ORGANIZATION

Foot-and-mouth disease vaccines. I. Comparison of vaccines prepared from virus inactivated with formalin and adsorbed on aluminum hydroxide gel with saponin and virus inactivated with acetyleneimine and emulsified with incomplete Freund's adjuvant. Collaborative research Plum Island Animal Disease Center and Pan-American Foot-and-Mouth Disease Center. *Bltm Centro Panamericano Fiebre Aftosa 19-20*: 9-16, 1975.

13. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE AND PAN-AMERICAN HEALTH ORGANIZATION

Foot-and-mouth disease vaccines. II. Studies on the duration of immunity in cattle and pigs. Collaborative research Plum Island Animal Disease Center and Pan-American Foot-and-Mouth Disease Center. *Bltm Centro Panamericano Fiebre Aftosa 19-20*: 24-30, 1975.

## resúmenes

## abstracts

BURROWS, R., MANN, J.A., GOODRIDGE, D. CHAPMAN, W.G.

Texto en inglés. *J. Hyg., Camb.* 73 (1): 101-107, 1974. [The Animal Virus Research Institute, Pirbright, Woking, Surrey, England]

*Enfermedad vesicular del cerdo: Tentativas para transmitir la infección al bovino y ovino*

Fueron investigadas las respuestas de los bovinos y ovinos a la exposición prolongada e íntima a cerdos infectados con la enfermedad vesicular del cerdo (EVC). Se inocularon ocho cerdos en ambos talones de las dos patas anteriores con la cepa Inglaterra/72 del virus EVC. A las 48 horas los porcinos fueron transferidos a habitaciones que contenían vacunos y ovinos en donde se los mantuvo por once días. Se extrajeron diariamente muestras esófago-faríngeas y muestras rectales de los bovinos y ovinos y también se tomaron muestras de la leche de las vacas. Todos los cerdos inoculados desarrollaron lesiones primarias dentro de 48 horas y lesiones secundarias dentro de tres a cuatro días. Se encontraron concentraciones máximas de virus en varias muestras recolectadas de los porcinos desde el tercero al quinto día. Relativamente pocos aislamientos del virus fueron efectuados de muestras extraídas después del octavo día. Sin embargo, el virus fue excretado en la materia fecal durante períodos más prolongados.

No se observó ninguna evidencia clínica de la enfermedad en los bovinos en contacto, aunque intermitentemente se recobraron pequeñas cantidades de virus de la faringe, de la leche y de los toques rectales. No hubo indicaciones de multiplicación viral en los bovinos. El virus inoculado en la glándula mamaria de las vacas desapareció rápidamente. Aumentos leves en la actividad viro-neutralizante de los sueros fueron detectados

*Swine vesicular disease: Attempts to transmit infection to cattle and sheep*

The responses of cattle and sheep to prolonged and intimate exposure to pigs infected with swine vesicular disease (SVD) were investigated. Eight pigs were inoculated in both heels of both fore feet with the England/72 strain of SVD virus. After 48 hours the pigs were moved into rooms containing cattle and sheep and left there for eleven days. Oesophageal-pharyngeal samples and rectal swabs were taken daily from cattle and sheep and milk samples were also taken from the cattle. All inoculated pigs developed primary lesions within 48 hours and secondary lesions within three to four days. Peak concentrations of virus were found in various samples collected from the pigs from the third to the fifth day. Relatively few isolations of virus were made from samples taken after the eighth day. However, virus was excreted in the feces for longer periods.

No clinical evidence of disease was seen in the contact cattle although small amounts of virus were recovered intermittently from the pharynx, milk and rectal swabs. There were no indications of virus multiplication in the cattle. Virus inoculated into the mammary gland of cattle disappeared rapidly. Slight increases in the virus neutralizing activity of sera were detected during the course of the experiment but these increases were not as great as those found in subclinical infections of pigs. No obvious signs of disease were observed in contact sheep. There was some indication that virus growth had taken

durante el curso del experimento pero estos aumentos no fueron tan grandes como los encontrados en las infecciones subclínicas de los cerdos. No se observaron síntomas evidentes de la enfermedad en los ovinos en contacto. Hubo cierto indicio de que el crecimiento del virus había ocurrido en los ovinos ya que grandes cantidades de virus fueron recobradas de la región faríngea a los cuatro a siete días después de la exposición. Además, seis de las ocho ovejas usadas en la prueba desarrollaron títulos de anticuerpos neutralizantes significativos, los que se mantuvieron durante por lo menos seis semanas en cuatro animales.

place in the sheep since large amounts of virus were recovered from the pharyngeal region at four to seven days after exposure. In addition, six of the eight sheep involved developed significant neutralizing antibody titers which were maintained (in four animals) for at least six weeks.

CALLIS, J.J., McKERCHER, P.D., GRAVES, J.H.

Texto en inglés. *Proc. 3rd int. Pig Vet.Soc. Mtg*, Lyon, junio, 1974. (*FMD Bull. Wellcome* 13 (7): 85, 1974). [Plum Island Animal Disease Center, P.O. Box 848, Greenport, Long Island, New York 11944, USA]

*Virus de la enfermedad vesicular del cerdo europea*

Se llevaron a cabo estudios para determinar la sobrevivencia del virus de la enfermedad vesicular del cerdo (EVC) en el jamón enlatado, parcialmente cocido, en el salame crudo seco y en la salchicha "pepperoni", preparados con carne de cerdo infectada. Los jamones objeto de la investigación fueron enlatados y calentados en agua caliente hasta llegar a una temperatura interna de 69° C, luego de lo cual fueron enfriados en agua helada. No se pudo rescatar ningún virus de los jamones tratados de esta manera a pesar de que antes de procesarlos originaron la EVC cuando se los dio de comer a cerdos susceptibles. Las sales y el azúcar utilizados en la preparación de los jamones parecieron no tener ningún efecto adverso en la sobrevivencia del virus y se pensó que la ausencia de infecciosidad en los jamones procesados estaba relacionada con la inactivación térmica durante el procedimiento de elaboración.

*European swine vesicular disease virus*

Studies were undertaken to determine the survival of swine vesicular disease (SVD) virus in partly cooked canned hams, dry hard salami and pepperoni sausage prepared from infective pork. The hams under investigation were canned and heated in hot water until an internal temperature of 69° C was reached, at which time they were cooled in ice water. Virus could not be recovered from hams treated in this way even though they caused SVD when fed to susceptible pigs before processing. The salts and sugar used in the preparation of the hams appeared to have no adverse effect on virus survival and the absence of infectivity in processed hams was thought to be associated with heat inactivation during the processing procedure.

The salami sausages were also prepared from meat from SVD virus-infected swine. Mixtures used in curing the sausage contained sugar, salts and a variety of sea-

Los salames igualmente fueron preparados con carne procedente de porcinos infectados con el virus de la EVC. Las sustancias empleadas en la preservación de los mismos contenían azúcar, sales y una variedad de condimentos. Cultivos comerciales normales de lactobacilos fueron utilizados en el proceso de fermentación. Las carnes fueron envasadas en tripas para embutidos, naturales o sintéticas, y se las dejó curar durante dos a tres días antes de ahumarlas. El virus de la EVC sobrevivió a todos estos procedimientos y pudo ser recuperado del embutido de salame aún hasta 100 días después de la preparación. Se están llevando a cabo actualmente estudios sobre la sobrevivencia del virus de la EVC en la salchicha "pepperoni" preparada con carne de cerdo infectada.

sonings. Standard commercial starter cultures of *Lactobacillus* were used in the fermentation process. The meat was packed in either synthetic or natural casings and allowed to cure for two to three days before smoking. SVD virus survived all these procedures and could be recovered from the salami sausage as long as 100 days after preparation. Studies are currently being carried out on the survival of SVD virus in pepperoni sausage prepared from infected pig meat.

DAWE, P.

Texto en inglés. *Vet. Rec.* 94 (19): 430, 1974. (*FMD Bull. Wellcome* 13 (5): 62, 1974). [The Animal Virus Research Institute, Pirbright, Woking, Surrey, England]

*La viabilidad de la enfermedad vesicular del cerdo en los cadáveres porcinos y en las heces*

*Viability of swine vesicular disease in carcasses and feces*

Una de las características más notables del virus de la enfermedad vesicular del cerdo (EVC) es su prolongada viabilidad. Esta capacidad para vivir ha sido demostrada por los resultados obtenidos con material procedente de cerdos empleados experimentalmente para el diagnóstico inicial de la enfermedad. Se almacenaron a -20° C trozos de los cadáveres de cerdos sacrificados mientras presentaban lesiones y el estiércol recolectado de los establos fue acumulado en bolsas plásticas y almacenado de 12 a 17° C. Periódicamente se tomaron muestras del estiércol habiéndose rescatado virus viable por última vez, después de 138 días de almacenamiento. Se tomaron muestras de material proveniente de cadáveres porcinos después

One of the most striking characteristics of the swine vesicular disease (SVD) virus is its prolonged viability. This has been demonstrated by results obtained with material from experimental pigs used for the initial diagnosis of the disease. Parts of the carcasses of pigs slaughtered while showing lesions were stored at -20° C and dung from the looseboxes was stored in plastic bags at 12 to 17° C. The dung was sampled periodically and viable virus was last recovered after 138 days of storage. Carcasse material was sampled after 11 months and showed no significant drop in infectivity on storage. The stability of SVD virus in carcasse materials emphasizes the importance of both the Diseases of Animals (Waste Food) Order and

de 11 meses, sin mostrar disminución significativa de su infecciosidad a pesar de su almacenamiento. La estabilidad del virus de EVC en los materiales procedentes de cadáveres porcinos, pone de relieve la importancia del Decreto sobre las Enfermedades de los Animales (Residuos alimenticios) y del Decreto sobre el Movimiento de Porcinos (Precauciones sobre los Desechos Alimenticios) en el control de la EVC.

the Movement of Pigs (Waste Food Precautions) Order in the control of SVD.

MOWAT, G.N., PRINCE, M.J., SPIER, R.E., STAPLE, R.F.

Texto en inglés. *Arch. ges. Virusforsch*, 44 (4): 350-360, 1974. [The Animal Virus Research Institute, Pirbright, Woking, Surrey, England]

*Estudios preliminares sobre el desarrollo de una vacuna contra la enfermedad vesicular del cerdo*

*Preliminary studies on the development of a swine vesicular disease vaccine*

Se describen las investigaciones sobre la producción del virus de la enfermedad vesicular del cerdo (EVC), su inactivación y la inmunogenicidad de las vacunas preparadas con él. El virus (UK 27/72) podía ser cultivado tanto en cultivos de monoestratos como en suspensión de células IB-RS-2. Títulos virales de  $10^{8,5}$  a  $10^{9,0}$  UFP/ml fueron obtenidos regularmente en aproximadamente 24 horas en ambos sistemas. Se decidió emplear el sistema de monocapas para la producción de virus en gran escala, por ahora. La inactivación del virus con AEI demostraba ir acompañada de una reacción de primer orden tanto a  $26^{\circ}\text{C}$  como a  $37^{\circ}\text{C}$ . A  $26^{\circ}\text{C}$  la tasa media de inactivación era de  $10^{0,66}$  UFP/hora y la duración media de 28 minutos. A  $37^{\circ}\text{C}$ , la tasa media era de  $10^{2,5}$  UFP/hora y la duración media de 8,8 minutos. Fue confirmada la inocuidad de las suspensiones virales inactivadas con 0,05% de AEI, ya sea por 9 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  o por 30 horas a  $26^{\circ}\text{C}$ . Al emplear beta-propiolactona, no fue posible producir líquidos libres

Investigations on the production of swine vesicular disease (SVD) virus, its inactivation and the immunogenicity of vaccines prepared from it are described. The virus (UK 27/72) could be grown in either monolayer or suspension cultures of IB-RS-2 cells. Virus titers of  $10^{8,5}$  to  $10^{9,0}$  PFU/ml were obtained regularly in both systems in approximately 24 hours. It was decided to use the monolayer system for large-scale production of virus at present. Inactivation of the virus with AEI was shown to follow a first order reaction at both  $26^{\circ}\text{C}$  and  $37^{\circ}\text{C}$ . At  $26^{\circ}\text{C}$  the mean rate of inactivation was  $10^{0,66}$  PFU/hour and the half-life 28 minutes. At  $37^{\circ}\text{C}$ , the mean rate was  $10^{2,05}$  PFU/hour and the half-life 8.8 minutes. The innocuity of viral suspensions inactivated with 0.05% AEI for either 9 hours at  $37^{\circ}\text{C}$  or 30 hours at  $26^{\circ}\text{C}$  was confirmed. Using beta propiolactone, it was not possible to produce fluids free of infectious virus even at concentrations as high as 0.25%.

Two vaccines were prepared from virus

de virus infeccioso aún a concentraciones tan elevadas como de 0,25%.

Dos vacunas fueron preparadas de virus cultivado en cultivo de monoestrato e inactivado con 0,05% de AEI por 30 horas a 26°C. La vacuna A contenía virus adsorbido en hidróxido de aluminio y 5 mg/dosis de saponina. La dosis era 3 ml que contenía 1 ml de antígeno. La vacuna B era una vacuna de doble emulsión que contenía virus concentrado y se la empleó en una dosis de 0,5 ml. Grupos de diez cerdos fueron inyectados con cada vacuna. La exposición fue mediante contacto con porcinos infectados. La vacuna A protegió completamente a 5 de 10 cerdos, la vacuna B, a 7 de 10. Cuando se produjeron lesiones en los cerdos vacunados, éstas fueron pasajeras y resultaron más pequeñas y menos desarrolladas que en los cerdos controles. A los siete días postvacunación fueron revelados títulos máximos de anticuerpos neutralizantes en los sueros de porcinos a los cuales se les administró cualquiera de los dos tipos de vacuna. Una declinación gradual en el título fue observada durante los 17 días siguientes. Los cerdos que recibieron la vacuna oleosa produjeron los títulos más altos. Las inmunoglobulinas que se desarrollaron siguieron la misma pauta usual de desarrollo de IgM e IgG encontrada con otros picornavirus.

grown in monolayer culture and inactivated with 0.05% AEI for 30 hours at 26° C. Vaccine A contained virus adsorbed on aluminium hydroxide and 5mg/dose saponin. The dose was 3.0 ml which contained 1.0 ml antigen. Vaccine B was a double emulsion vaccine containing concentrated virus and was used in a 0.5 ml dose. Groups of ten pigs were given each vaccine. Challenge was by contact with infected pigs. Vaccine A completely protected 5 of 10 pigs. Vaccine B, 7 of 10. When lesions did develop in vaccinated pigs they were smaller and less well developed than in control pigs and were transient. Peak neutralizing antibody titers developed in the sera of pigs given either type of vaccine at seven days post-vaccination. A gradual decline in titer was observed over the next 17 days. Pigs which received the oil vaccine produced the highest titers. The immunoglobulins which developed followed the usual pattern of IgM and IgG development found with other picornaviruses.

#### NABHOLZ, A.

Texto en inglés. *Wrl'd Anim. Rev.* 11: 20-23, 1974. (*FMD Bull. Wellcome* 13 (12): 120, 1974). [Diretor, Federal Veterinary Office, Berne, Switzerland]

#### *Lecciones para el futuro derivadas de los recientes brotes aftosos en Europa*

La situación aparentemente favorable en lo que respecta a la fiebre aftosa en Europa durante el período 1969 a 1973, es ilusoria. Los brotes en 1972 y en 1973 indican que las mayores epidemias y sus consecuencias económicas pueden ser prevenidas únicamente mediante la extrema vigilancia y por la

#### *Lessons for the future from the recent outbreaks of foot-and-mouth disease in Europe*

The apparently favorable situation as regards foot-and-mouth disease in Europe during the period 1969 to 1973 is deceptive. Outbreaks in 1972 and in 1973 indicate that major epizootics with their economic consequences can only be prevented by extreme vigilance and by vigorous ap-

aplicación de vigorosas medidas de control. La enfermedad originada por el virus tipo C se difundió a través del sudeste de Europa a fines de 1972. Los porcinos fueron los principales animales afectados, siendo la diseminación de la enfermedad únicamente impedida mediante la aplicación rigurosa de medidas preventivas sobre vastas regiones de los países involucrados. A principios de 1973, brotes causados por el virus tipo O comenzaron a ocurrir en las mismas regiones. Austria sufrió dos epizootias dentro de un breve período. España, en donde se había introducido la vacunación general y sistemática, sufrió una epizootia en octubre de 1972 causada por un subtipo A no conocido previamente en Europa. El mal causado por el virus A<sub>22</sub> hizo su aparición en la Tracia turca y Grecia durante 1972. Se requirió la intervención internacional para prevenir la propagación de este virus exótico más allá de Europa y para eliminarlo en Grecia y Turquía. Durante 1973, Grecia sufrió brotes causados por el virus O y también por el virus tipo Asia 1. La necesidad de mantener la zona "buffer" en Tracia, cuando todos los animales susceptibles sean vacunados contra el tipo Asia 1 es obvia.

plication of control measures. Disease caused by type C virus spread throughout south-east Europe in late 1972. Pigs were mainly affected and the spread of disease was only arrested by rigorous application of protective measures over large areas of the countries concerned. Early in 1973 outbreaks caused by type O virus began to occur in the same areas. Austria experienced two epizootics within a short time. Spain, where general systematic vaccination had been introduced, suffered an epizootic in October 1972 caused by an A subtype not previously known in Europe. Disease caused by A<sub>22</sub> virus appeared in Turkish Thrace and Greece during 1972. International action was required to prevent the spread of this exotic virus further into Europe and to eliminate it in Greece and Turkey. During 1973, Greece suffered outbreaks caused by O virus and also by the Asia 1 virus type. The need to maintain the buffer zone in Thrace, when all susceptible animals are vaccinated against type Asia 1, is obvious.

SOLYOM, F., HORVATH, Z.

Texto en húngaro. *Mag. Allatorv. Lap.* 29 (1): 6-9, 1974. (*FMD Bull. Wellcome* 13 (7): 83, 1974). [Phylaxia Vaccine and Food Manufacturing Company, Hungary]

*Persistencia del virus aftoso en el cerdo*

Fue investigada la sobrevivencia del virus aftoso en los órganos y tejidos de porcinos que se habían recuperado de la infección natural o que habían sido infectados experimentalmente. En el caso de 13 cerdos que habían sucumbido a la infección natural del tipo C a la edad de 16 a 18 meses, no pudo detectarse virus alguno en las muestras

*Persistence of foot-and-mouth disease virus in pigs*

The survival of foot-and-mouth disease virus in the organs and tissues of pigs which had recovered from natural infection or had been infected experimentally was investigated. In the case of 13 pigs which had succumbed to natural infection of type C at age 16 to 18 months, no virus could be detected in samples of vitreous humour;

del humor vitreo, el páncreas, los nódulos linfáticos submandibulares, el líquido sinovial ni las amígdalas. Los sueros de estos animales no contenían ningún anticuerpo contra ningún tipo del virus aftoso. Resultados semejantes fueron obtenidos en el caso de siete cerdos que habían padecido la infección natural en forma severa a los cuales se les extrajo muestras 2,5 años más tarde.

Cuando se infectaron cinco cerdos con una dosis de  $10^6$  DICT<sub>50</sub> del virus tipo C, aparecieron signos clínicos de la enfermedad a las 48 horas. Se detectaron elevados niveles de anticuerpos en las muestras serológicas extraídas a los 21 días postinfección (DPI). En todos los casos, los animales habían recuperado bastante de la infección a los 21 DPI. Se descubrió virus en el líquido sinovial y glándula tiroidea de un animal al cual se le sacó una muestra a los 26 DPI. No se detectó virus en las muestras similares extraídas a intervalos hasta los 64 DPI. También se detectó virus en la epiglotis y amígdalas a los 50 DPI y en el nódulo linfático mesentérico y en la médula del fémur a los 57 DPI. No pudo demostrarse nunca ningún virus en el páncreas, las adrenales, ovarios, tráquea, riñones, médula espinal o en la piel.

pancreas, submandibular lymph nodes, synovial fluids or tonsils. The sera of these animals contained no antibodies to any type of foot-and-mouth disease virus. Similar results were obtained in the case of seven pigs which had suffered severe natural infection and were sampled 2.5 years later.

When five sows were each infected with  $10^6$  TCID<sub>50</sub> of type C virus, clinical signs of disease appeared within 48 hours. High antibody levels were found in serum samples taken at 21 days post-infection (DPI). In all cases, the animals had largely recovered from the infection by 21 DPI. Virus was detected in the synovial fluid and thyroid gland of one animal sampled at 26 DPI. Virus was not detected in similar samples taken at times up to 64 DPI. Virus was also detected in the epiglottis and tonsils at 50 DPI and in the mesenteric lymph node and femoral medulla at 57 DPI. Virus could never be demonstrated in the pancreas, adrenals, ovaries, trachea, kidneys, spinal medulla or skin.



## bibliografía sobre enfermedades vesiculares

## vesicular diseases bibliography

BARTELING, S.J.; MELOEN, R.H.

Un método sencillo para la cuantificación de las partículas 140 S del virus aftoso. *Texto en inglés*. (A simple method for the quantification of 140 S particles of foot-and-mouth disease virus). *Arch. ges. Virusforsch.* 45 (4): 362-364, 1974. (*FMD Bull. Wellcome* 13 (12): 122, 1974. [Centraal Diergeneeskundig Instituut, Afd. Virologie, Hootribweg 39, Lelystad, Netherlands])

BURROWS, R.

Estudios comparativos de las cepas del virus de la enfermedad vesicular del cerdo aisladas de diferentes países. *Texto en inglés*. (Comparative studies of swine vesicular disease virus strains isolated from different countries). Trabajo presentado en el 3er. Congreso Internacional de la Sociedad Veterinaria Porcina, Lyon, junio, 1974 (en resumen solamente). Paper presented at the 3rd International Pig Veterinary Society Congress, Lyon, June, 1974 (abstract only). (*FMD Bull. Wellcome* 13 (9): 93, 1974). [The Animal Virus Research Institute, Pirbright, Woking, Surrey, England]

BURROWS, R. *et al.*

Enfermedad vesicular del cerdo: estudios virológicos de infecciones experimentales producidas por el virus England/72. *Texto en inglés*. (Swine vesicular disease: virological studies of experimental infections produced by the England/72). *J. Hyg., Camb.* 72 (1): 135-143, 1974. [The Animal Virus Research Institute, Pirbright, Woking, Surrey, England]

CHAWLA, S.K.

Desarrollo de un medio económico de cultivo celular para la producción de vacuna anti-aftosa. *Texto en inglés*. (Development of an inexpensive cell culture medium for the production of foot-and-mouth disease vaccine). *Arch. ges. Virusforsch.* 44 (4): 401-402, 1974. (*FMD Bull. Wellcome* 13 (9): 101, 1974). [The Animal Virus Research Institute, Pirbright, Woking, Surrey, England]

DRAVAI, G.; SZABO, J.; SZENT-IVANYI, M.

Anafilaxis tras la vacunación antiaftosa. *Texto en húngaro*. (Anafilaxis after vaccination against foot-and-mouth disease). (*Mag. Allatorv. Lap.* 29: 313-317, 1974. (*FMD Bull. Wellcome* 13 (11) 118, 1974. [Phylaxia, Szallas u. 5-7, Budapest, Hungary])

FORMAN, A.J. *et al.*

Estudios con el virus de la fiebre aftosa en el venado inglés (rojo, corzo, y paleta). II. Recuperación de virus y la respuesta serológica. *Texto en inglés*. (Studies with foot-and-mouth disease virus in British deer-red, fallow and roe. II. Recovery of virus and serological response). *J. Comp. Path.* 84 (2): 221-229, 1974. [The Animal Virus Research Institute, Pirbright, Woking, Surrey, England]

MONLUX, W.S.; GRAVES, J.H.; McKERCHER, P.D.

Lesiones cerebrales y de la médula espinal en porcinos inoculados con el virus de la enfermedad vesicular del cerdo (cepa Hong Kong). *Texto en inglés*. (Brain and spinal cord lesions in pigs inoculated with swine vesicular disease virus (Hong Kong strain). *Am. J. vet. Res.* 35 (5): 615-617, 1974. (*FMD Bull. Wellcome* 13 (7): 84, 1974). [Plum Island Animal Disease Center, Greenport, New York 11944, U.S.A.]

SELLEFS, R.F.; HERNIMAN, K.A.J.

Protección precoz de los porcinos frente a la fiebre aftosa. *Texto en inglés*. (Early protection of pigs against foot-and-mouth disease). *Brit. vet. J.* 130 (5): 440-445, 1974. (*FMD Bull. Wellcome* 13 (11): 116, 1974). [The Animal Virus Research Institute, Pirbright, Woking, Surrey, England]