

---

# BOLETIN

## del centro panamericano de fiebre aftosa

---

Nºs 21-22, enero-junio, 1976.  
Nos. 21-22, January-June, 1976.

**contenido**

**contents**

p.

Prevalencia de anticuerpos contra el antígeno asociado a la infección por virus (VIA) de la fiebre aftosa en bovinos del Chaco Paraguayo .....	1
<i>Félix J. Rosenberg; Hernán Málaga Cruz; A. Alonso Fernández; Tomás Martínez; Aníbal Barreto</i>	
Prevalence of antibodies against foot-and-mouth disease virus-infection-associated antigen (VIA) in cattle of the Paraguayan Chaco .....	9
<i>Félix J. Rosenberg; Hernán Málaga Cruz; A. Alonso Fernández; Tomás Martínez; Aníbal Barreto</i>	
Prueba de microneutralización para estudios de anticuerpos de la fiebre aftosa .....	17
<i>Maria Elma V. Ferreira</i>	
Microtiter neutralization test for the study of foot-and-mouth disease antibodies .....	21
<i>Maria Elma V. Ferreira</i>	

Prueba de neutralización por reducción de placas para la evaluación de anticuerpos contra la fiebre aftosa .....	25
<i>P. Augé de Mello</i>	
Plaque reduction neutralization test for the assay of antibodies against foot-and-mouth disease .....	30
<i>P. Augé de Mello</i>	
Encuesta serológica de fiebre aftosa en ovinos en el valle central de Cochabamba, Bolivia .....	35
<i>Ministerio de Asuntos Campesinos y Agropecuarios de Bolivia; Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación; Organización Panamericana de la Salud</i>	
Serological survey of foot-and-mounth disease in sheep in the Central valley of Cochabamba, Bolivia .....	40
<i>Ministry of Agricultural and Peasant Affairs of Bolivia; Food and Agriculture Organization of the United Nations; Pan American Health Organization</i>	
Vacunas contra la fiebre aftosa con virus producido en cultivos celulares con suero bovino tratado con polietilenglicol (PEG) .....	44
<i>Daniel Abaracón; Homero Giacometti</i>	
Vaccines against foot-and-mouth disease in virus produced in cell cultures with bovine serum treated with polyethyleneglycol (PEG) .....	49
<i>Daniel Abaracón; Homero Giacometti</i>	
Resúmenes - Abstracts .....	54
Bibliografía sobre enfermedades vesiculares Vesicular diseases bibliography .....	58

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

**PREVALENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA EL ANTIGENO ASOCIADO A  
LA INFECCION POR VIRUS (VIA) DE LA FIEBRE AFTOSA  
EN BOVINOS DEL CHACO PARAGUAYO**

Félix J. Rosenberg\*, Hernán Málaga Cruz\*, A. Alonso Fernández\*,  
Tomás Martínez \*\*, Aníbal Barreto\*\*

**RESUMEN**

Sueros de bovinos del Chaco (Paraguay) fueron analizados para determinar la presencia de anticuerpos a antígeno asociado a infección viral (VIA). Una muestra de 1.860 bovinos fue seleccionada por un muestreo, en dos etapas, de una población total de aproximadamente 100.000 bovinos.

La prevalencia estimada fue de 0,26. La prevalencia para bovinos >2 años fue de 0,38, y <2 años fue de 0,08.

El área fue dividida en 6 regiones geopolíticas, de acuerdo con la historia de fiebre aftosa en cada una. Las dos regiones que habían tenido los más severos brotes de fiebre aftosa, aproximadamente 2 años antes del estudio, tuvieron una prevalencia de 0,34 y 0,40. Las otras 4 áreas, con una menor notificación de casos clínicos, dieron una prevalencia que varió entre 0,16 y 0,24.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las poblaciones, según el tamaño, para los bovinos >2 años. Anticuerpos VIA en bovinos <2 años fueron probablemente debidos al calostro; no obstante, la posibilidad de trasmisión de virus de bovinos portadores no puede ser excluida.

Las siguientes variables deben ser tomadas en cuenta cuando se quiera determinar la prevalencia de infección, para una región, mediante estudios serológicos: a) período de tiempo transcurrido desde la última ocurrencia de fiebre aftosa; b) edad del animal; c) persistencia de anticuerpos a VIA; d) nº y localización de bovinos introducidos en el área.

**INTRODUCCION**

El control de la fiebre aftosa es una de las principales actividades de salud animal en América del Sur. Hoy en día se reconoce que la estrategia del combate debe basarse en las características epidemiológicas particulares de la enfermedad a nivel regional (1). Si bien los sistemas de información sobre fiebre aftosa se hallan desarrollados en la mayor parte del continente, existen circunstancias en que el apoyo del laboratorio es fundamental para el diagnóstico regional de situación. Para determinar niveles poblacionales de infección,

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

\*\*Servicio Nacional de Lucha contra la Fiebre Aftosa (SENALFA), Edificio Patria 4: piso, Asunción, Paraguay.

las pruebas de medición de anticuerpos de neutralización son poco eficaces puesto que en la mayoría de los países de Sudamérica, los bovinos son vacunados regularmente.

En 1966 Cowan y Graves (2) describieron un antígeno no estructural asociado a la replicación del virus de la fiebre aftosa (VIA). En animales infectados este antígeno induce la formación de anticuerpos similares para todos los tipos y subtipos del virus; sin embargo, es específico de la enfermedad. McVicar y Sutmöller (3) sugirieron el uso de la doble difusión en gel de agar para la detección de anticuerpos VIA en encuestas de terreno. En

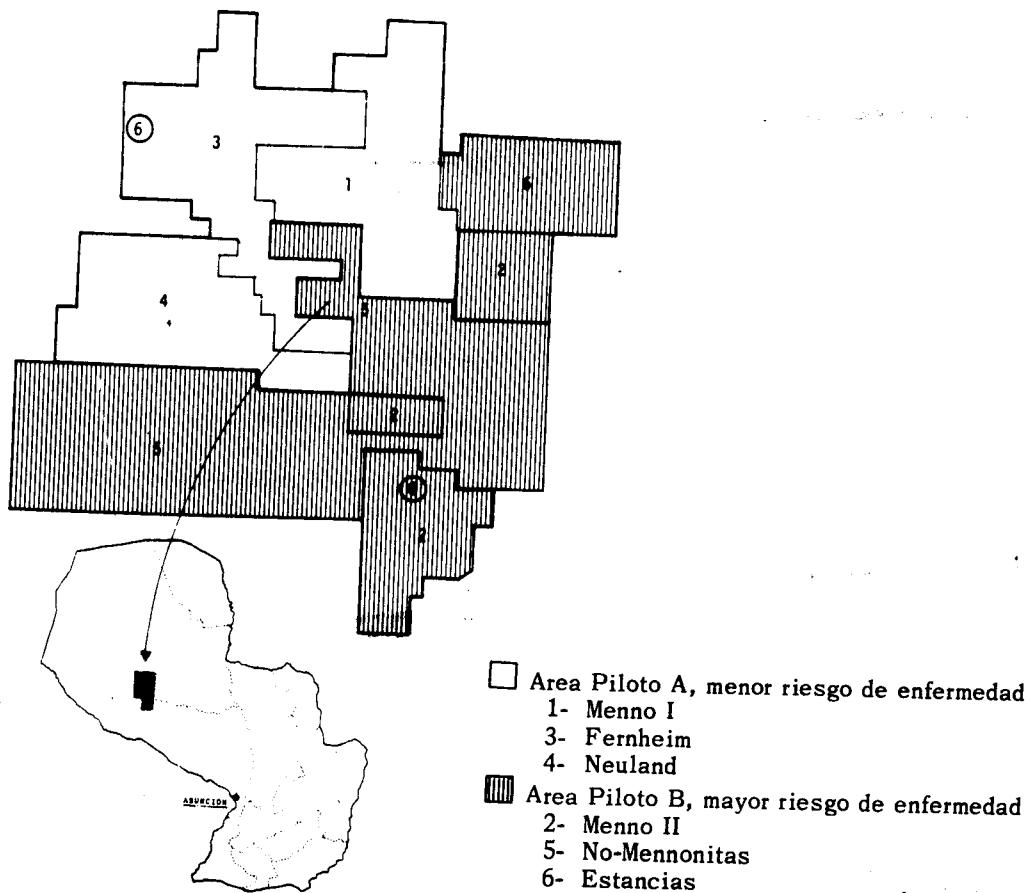
experimentos, esta prueba demostró ser de gran eficacia para la detección y el seguimiento de animales infectados independientemente del desarrollo o no de lesiones clínicas de fiebre aftosa (4).

El presente trabajo evalúa la utilidad de la detección de anticuerpos contra el VIA para detectar infecciones por virus de la fiebre aftosa en grandes poblaciones.

#### MATERIAL Y METODOS

La encuesta fue realizada en el departamento Boquerón, Chaco, Paraguay (Mapa 1),

MAPA 1 - *Distribución de regiones geopolíticas. Colonias Mennonitas. 1973*



en julio de 1973, sobre una población bovina de aproximadamente 100.000 cabezas pertenecientes a unos 1.800 productores, en su mayoría de las colonias Mennonitas y distribuidas en 151 aldeas y 3 estancias.

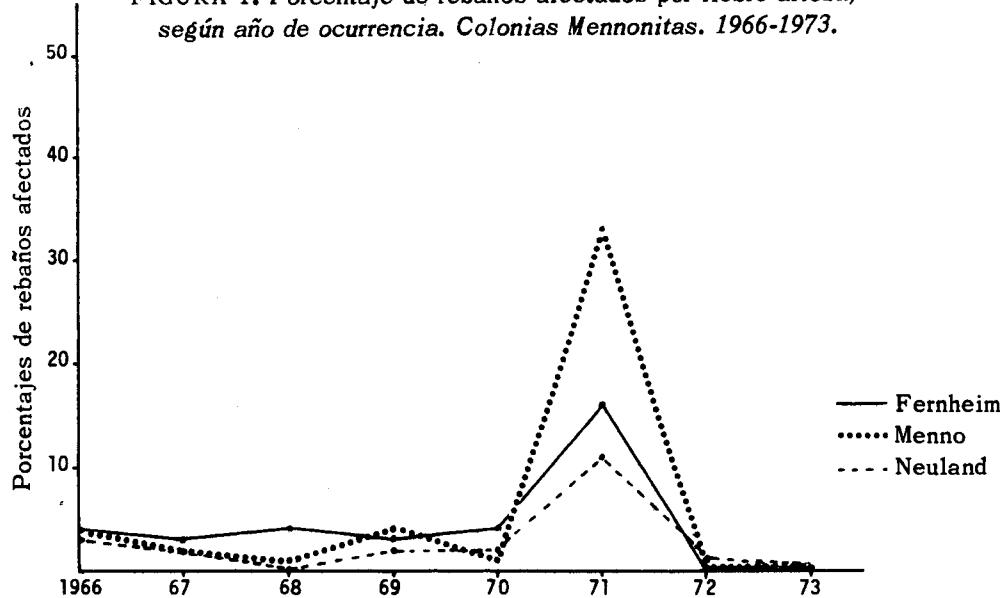
En una encuesta retrospectiva realizada en agosto de 1971, cerca del 50% de los hacendados informaron que nunca había ocurrido fiebre aftosa en sus establecimientos (Alvarez y Kaethler, datos no publicados). Entre 1966 y 1970, la tasa anual de rebaños afectados no había sobrepasado 0,04 (Fig. 1).

En mayo de 1971 comenzó una epidemia ocasionada por el subtipo O<sub>1</sub> del virus de la fiebre aftosa. En agosto, en el pico de la onda epidémica, alrededor de la mitad de los bovinos de las aldeas y la cuarta parte de los establecimientos ya habían sido afectados por la enfermedad (Figs. 1 y 2).

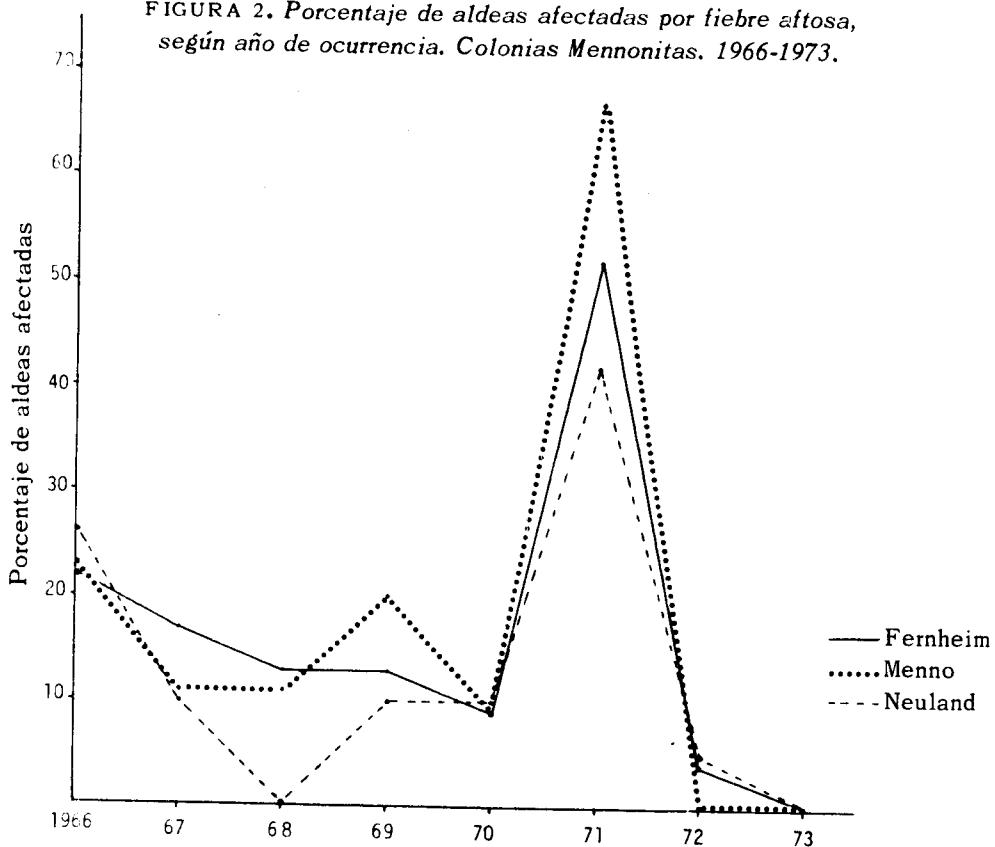
Hasta ese momento, no se había desarrollado ninguna actividad organizada de control de la fiebre aftosa en la zona; no obstante, algunos propietarios vacunaban ocasionalmente su ganado.

En enero de 1972, cuando ocurrieron los últimos casos de fiebre aftosa, el Servicio Nacional de Lucha contra la Fiebre Aftosa (SENALFA) de Paraguay inició dos programas piloto para la erradicación de la enfermedad en el área de estudio. Tanto los bovinos del área de menor riesgo (Area A) como los de mayor riesgo (Area B), fueron vacunados 3 veces durante ese año. En todos los casos se utilizó una vacuna comercial producida en cultivo de tejidos e inactivada con acetiletilenimina (AEI). A partir de diciembre de 1972, no se realizaron vacunaciones contra la fiebre aftosa en ninguna de las dos áreas.

**FIGURA 1. Porcentaje de rebaños afectados por fiebre aftosa, según año de ocurrencia. Colonias Mennonitas. 1966-1973.**



**FIGURA 2. Porcentaje de aldeas afectadas por fiebre aftosa, según año de ocurrencia. Colonias Mennonitas. 1966-1973.**



#### Selección de la muestra

La muestra fue seleccionada mediante un procedimiento de dos etapas (5). Debido a las características sociológicas particulares del área se escogieron las aldeas como unidades primarias de muestreo en lugar de rebaños bovinos. La selección de la muestra fue realizada según las siguientes variables: a) distribución geográfica de la población bovina y b) edad de los animales (Tabla 1).

El Área A (menor riesgo de enfermedad) estuvo compuesta por: Menno I (Nº 1), Fernheim (Nº 3) y Neuland (Nº 4). El Área B (mayor riesgo de enfermedad) comprendía dos grupos de aldeas, Menno II (Nº 2) y aldeas no-Mennonitas (Nº 5) y un grupo de estancias (Nº 6).

Los bovinos fueron divididos en dos estratos: los mayores y los menores de 2 años.

#### Pruebas serológicas

Las muestras de sangre de la población fueron recolectadas en julio de 1973, aproximadamente 18 meses después del último caso registrado de fiebre aftosa. Un grupo de terneros menores de 2 años fue nuevamente sangrado en noviembre de 1973. Los sueros fueron mantenidos a 4° C durante 3 a 10 días y posteriormente congelados a -20° C hasta su utilización.

Para la detección de anticuerpos VIA se utilizó la prueba de doble difusión en agar (3). El antígeno VIA fue preparado según la técnica descrita por Alonso Fernández y Sondahl (6).

## RESULTADOS

### *Prevalencia de anticuerpos VIA*

La tasa global de bovinos positivos en la población fue de  $0,26 \pm 0,02$  con un límite de confianza de 95% (Tabla 2). Las tasas fueron significativamente mayores en el grupo de animales de más de dos años ( $0,38 \pm 0,02$ , 95%) que en el grupo de los menores ( $0,08 \pm 0,03$ , 95%). Las diferencias entre ambos estratos etarios fueron significativas en todos los grupos de aldeas considerados. La tasa de bovinos positivos en los grupos 2 y 5 (0,40 y 0,34 respectivamente) fue mayor que en los grupos restantes, en las que varió entre 0,16 y 0,24. Las diferencias fueron significativas en ambos estratos etarios.

Con el fin de determinar la existencia de asociación entre enfermedad clínica y la tasa de prevalencia de anticuerpos VIA, se analizaron los resultados de acuerdo con la ocu-

rrencia o no de notificación de la enfermedad en las aldeas durante la encuesta de 1971. Hubo una asociación significativa entre el registro de fiebre aftosa y las tasas de prevalencia halladas ( $X^2 = 35,4$  P < 0,001) (Tabla 3). La prueba de Chi cuadrado fue significativa para ambos estratos de edad ( $< 2$  años = 12,88;  $> 2$  años = 28,47).

También se analizaron los resultados del estudio de prevalencia de acuerdo con el tamaño de la población animal en las aldeas muestreadas. Con ese fin éstas fueron divididas en tres categorías: menos de 350 bovinos; entre 350 y 950 y más de 950 bovinos. Tal como se observa en la Tabla 4 los bovinos mayores de 2 años pertenecientes a aldeas de más de 950 cabezas tuvieron un porcentaje de positivos significativamente mayor que en los de las aldeas de poblaciones menores ( $X^2 = 10,7$ ; P < 0,01).

**TABLA 1. Estratificación de los bovinos muestreados. Colonias Mennonitas, 1973.**

Área piloto	Grupo de aldeas	Población			Muestra		
		Aldeas	Predios	Bovinos	Aldeas	Bovinos	> 2 años
A	1 (Menno I)	65	690	28.715	12	189	285
A	3 (Fernheim)	31	432	20.320	9	142	210
A	4 (Neuland)	27	217	13.731	7	112	168
B	2 (Menno II)	19	265	16.329	8	118	194
B	5 (No-Mennonitas)	9	232	18.805	9	128	196
B	6 (Estancias)	3	3	10.000	3	54	94
<b>Totales</b>		<b>154</b>	<b>1.839</b>	<b>107.900</b>	<b>48</b>	<b>743</b>	<b>1.147</b>

**TABLA 2. Número y tasas de prevalencia de bovinos positivos al antígeno VIA según distribución geográfica y estratos etarios. Colonias Mennonitas, 1973.**

Grupo de aldeas	E d a d				Total	
	< 2 años		> 2 años		Nº	Tasa*
	Nº	Tasa	Nº	Tasa		
1	9	0,05	106	0,37	115	$0,24 \pm 0,04$
2	17	0,14	107	0,55	124	$0,40 \pm 0,05$
3	5	0,04	66	0,31	71	$0,20 \pm 0,04$
4	5	0,04	40	0,24	45	$0,16 \pm 0,04$
5	24	0,19	85	0,43	109	$0,34 \pm 0,05$
6	2	0,04	31	0,33	33	$0,22 \pm 0,07$
Total	62	$0,08 \pm 0,03$	435	$0,38 \pm 0,02$	497	$0,26 \pm 0,02$

\* Límites de confianza (95%).

**TABLA 3. Número y porcentaje de animales positivos y negativos al antígeno VIA según edad y experiencia clínica de fiebre aftosa\*. Colonias Mennonitas, 1973.**

	Menores de 2 años				Mayores de 2 años				Total			
	Positivo		Negativo		Positivo		Negativo		Positivo		Negativo	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Con fiebre aftosa	34	9	348	91	258	43	337	57	292	30	685	70
Sin fiebre aftosa	4	2	231	98	92	26	263	74	95	16	494	84
Total	38	6	579	94	350	37	600	63	388	25	1179	75

\* No se dispone de información sobre la historia clínica de fiebre aftosa en el grupo de aldeas 5.

**TABLA 4. Número y porcentaje de animales positivos y negativos al antígeno VIA según edad y tamaño de la población bovina en las aldeas. Colonias Mennonitas, 1973.**

Población bovina en la aldea	Menores de 2 años				Mayores de 2 años			
	Positivo		Negativo		Positivo		Negativo	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
< 350	12	8	147	92	85	36	149	64
350 - 950	30	10	276	90	158	33	317	67
> 950	20	7	260	93	192	44	245	56
Total	62	8	683	92	435	38	711	62

#### DISCUSION

Puesto que la encuesta serológica se realizó en julio de 1973, 18 meses después de la epidemia, era de esperar que algunos bovinos menores de 2 años fueran positivos al VIA. Del 8% de positivos en este grupo (Tabla 2) varios tenían menos de 6 meses de edad en el momento de la sangría. Es posible que en estos terneros los anticuerpos VIA fueran de origen calostral ya que en noviembre de 1973 no

fue posible detectar anticuerpos contra el VIA en animales menores de 2 años en 4 de las 6 aldeas donde se habían hallado terreros positivos 4 meses antes. Algunos terneros positivos en las 2 aldeas restantes estuvieron próximos a animales que enfermaron fuera del área pioto durante 1972. Ocho terneros con 10 a 18 meses de edad, no tenían historia de haber estado en contacto con ganado enfermo; sin embargo, fueron positivos al VIA. Esto podría indicar que hubo transmisión de virus de casos subclínicos o portadores.

Por este motivo, cuando se interpreten resultados de encuestas para anticuerpos VIA, se deberá tener en cuenta que si bien animales muy jóvenes pueden tener anticuerpos maternos, también es posible que ocasionalmente ocurra transmisión del virus de la fiebre aftosa de portadores a terneros recién nacidos o animales mayores. Esta última posibilidad aún no ha sido probada experimentalmente.

La vacuna inactivada con AEI utilizada en ambas áreas piloto probablemente no causó un aumento significativo en el número de bovinos positivos, ya que tiene una baja probabilidad de virus vivo residual(7).

Los grupos de aldeas 2 y 5 del Área B, con alto riesgo de enfermedad, tuvieron más altos porcentajes de bovinos positivos que los grupos restantes. El grupo 6, aunque también pertenece al Área B, tuvo una tasa de animales positivos al VIA relativamente baja debido al elevado influjo de bovinos provenientes del Área A.

Las diferencias altamente significativas halladas entre las aldeas con y sin registro de aftosa durante el brote de 1971, refuerzan la hipótesis de que las diferencias entre las tasas de bovinos positivos son debidas a riesgos variables de enfermar. La tasa de 0,26 de adultos positivos en las aldeas no afectadas merece un comentario especial. Estos animales pudieron haberse afectado al final de la epidemia; sin embargo, esto no fue observado (Kaethler, comunicado personal). Pueden haber padecido infección subclínica, tal como ha sido observado aun en bovinos no vacunados (4); por último, pueden haber sido introducidos de aldeas vecinas infectadas. Esto último es lo más probable, dado el movimiento frecuente y no registrado que ocurre dentro de las colonias Mennonitas, especialmente hacia y desde las estancias (grupo 6), lo cual concuerda con la observación de tasas de prevalencia significadamente mayores en las aldeas de más de 950 bovinos.

## CONCLUSION

Las encuestas serológicas en grandes poblaciones de bovinos pueden contribuir de forma efectiva al diagnóstico epidemiológico de infecciones por fiebre aftosa en aquellas áreas de América del Sur en que se están desarrollando programas de control. Sin embargo, con el fin de utilizar de la mejor forma posible los resultados de estas encuestas, los siguientes parámetros deberán ser tomados en cuenta:

### *1. Edad de la población animal*

Animales muy jóvenes pueden poseer anticuerpos pasivamente transferidos, lo que no implica que haya habido replicación activa de virus. La selección del ganado a ser encuestado de acuerdo con estructuras etarias es crítica para la detección de la última ocurrencia de fiebre aftosa en el área. La posibilidad de transmisión de virus de portadores de fiebre aftosa a terneros recién nacidos o animales mayores tal como fue sugerido por Hedger (8) y Augé *et al.* (datos no publicados) deberá ser investigada.

### *2. Persistencia de los anticuerpos VIA*

En un estudio anterior (4) se informó que anticuerpos VIA persistieron por lo menos 15 meses postinfección en 5 de 12 bovinos infectados, independientemente de que los animales hubieran o no padecido síntomas clínicos de la enfermedad. En este estudio, aproximadamente 40% de los animales fueron positivos a la prueba de VIA, aun cuando una parte de la población del área piloto posiblemente no estuvo expuesta al virus durante la epidemia de 1971. Podemos presumir, pues, que los anticuerpos contra el antígeno VIA persistieron más tiempo en el estudio del Chaco que en el estudio previo. La causa de esta presencia continua de anticuerpos VIA puede residir en diferencias de cepas de virus, en las pequeñas cantidades de polimerasa contenidas en las vacunas pudiendo actuar como "booster" o en la frecuencia de la infección.

Si bien en la presente encuesta se consideró que la población había sufrido una infección única, cuando se encuesten poblaciones sin historia de la enfermedad se deberá tener en cuenta que infecciones frecuentes con tipos diferentes del virus de fiebre aftosa estimulan respuestas de mayor duración.

### 3. Movimiento de ganado

En América del Sur el ganado bovino transita frecuentemente a través de distancias considerables con fines de comercialización. Por lo tanto, toda encuesta serológica debe incluir información confiable sobre el recambio de ganado y los sitios de origen del gana-

do introducido al área. Animales provenientes de áreas de alta incidencia de la enfermedad aumentarán la tasa de prevalencia de anticuerpos VIA en la población sin que esto refleje las tasas de infección reales para el ganado nativo.

Las encuestas para anticuerpos VIA pueden jugar un papel importante para determinar las tasas de infección de grandes poblaciones bovinas vacunadas y pueden constituir una herramienta útil para la vigilancia epidemiológica retrospectiva. Encuestas repetidas anualmente pueden ser un medio particularmente confiable para evaluar el progreso de los programas de control de la fiebre aftosa.

### REFERENCIAS

1. ROSENBERG, F.J.; GOIĆ M., R.  
Programas de control y prevención de la fiebre aftosa en las Américas. *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 12: 1-22, 1973.
2. COWAN, K.M.; GRAVES, J.H.  
A third antigenic component associated with foot-and-mouth disease infection. *Virology* 30 (4): 528-540, 1966.
3. McVICAR, J.W.; SUTMOLLER, P.  
Foot-and-mouth disease: The agar gel diffusion precipitation test for antibody to virus-infection-associated (VIA) antigen as a tool for epizootiologic surveys. *Am. J. Epidemiol.* 92 (4): 273-278, 1970.
4. ALONSO FERNANDEZ, A.; AUGÉ DE MELLO, P.; GOMES, I.; ROSENBERG, F.J.  
The use of virus-infection-associated antigen (VIA) in the detection of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus. *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 17-18: 17-22, 1975.
5. HENSEN, N.H.; HURWITZ, W.N.; MEDOW, W.G.  
*In "Sample surveys methods and theory"*. Vol. 1, J. Wiley Ed. N. York, 1970.
6. ALONSO FERNANDEZ, A.; SONDAHL, M.S.  
Preparación y concentración de los antígenos 140 S, 12 S y VIA del virus de la fiebre aftosa. *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 17-18: 1-9, 1975.
7. GRAVES, J.H.; ARLINGHAUS, R.B.  
Acetyleneimine in the preparation of inactivated foot-and-mouth disease vaccines. *Proceedings 71 Am. Meeting US Livestock Sanitary Assn.* pp. 396-403, 1967.
8. HEDGER, R.S.  
The isolation and characterization of foot-and-mouth disease virus from clinically normal herds in Botswana. *J. Hyg., Camb.* 66 (1): 27-36, 1968.

**PREVALENCE OF ANTIBODIES AGAINST FOOT-AND-MOUTH DISEASE  
VIRUS-INFECTION-ASSOCIATED ANTIGEN (VIA) IN CATTLE  
OF THE PARAGUAYAN CHACO**

Félix J. Rosenberg\*, Hernán Málaga Cruz\*, A. Alonso Fernández\*,  
Tomás Martínez\*\*, Aníbal Barreto\*\*

**ABSTRACT**

Sera from cattle in the Chaco region of Paraguay were tested for the presence of antibodies to virus-infection-associated (VIA) antigen. A sample of 1,890 cattle was selected, by a two-stage sampling procedure, from a total population of approximately 100,000 cattle.

The overall rate of positive cattle in the population was 0.26. The rate for cattle over 2 years old was 0.38; and for cattle under 2 years, 0.08.

The area was divided into six geo-political regions, according to the foot-and-mouth disease (FMD) history of each. The two regions which had had a severe FMD outbreak approximately two years previous to the study had positive rates of 0.34 and 0.40. The other four areas, where fewer cases of clinical disease had been reported, gave rates which varied between 0.16 and 0.24.

Significant differences were also found between populations of different sizes, although this difference was only noted in cattle over two years old. VIA antibodies in cattle under two years were probably due to colostrum, although the possibility of virus transmission from carrier cattle cannot be excluded.

The following variables should be taken into account when determining regional infection rates through serological studies: (a) period of time elapsed since last FMD occurrence; (b) age of animal population; (c) persistence of antibodies to VIA; and (d) number and location of cattle brought into the area.

**INTRODUCTION**

Campaigns against foot-and-mouth disease (FMD) form a major component of animal health programs in South America. It is now recognized that strategies for control of FMD must be based on the specific regional epidemiological characteristics of the disease (1). Although FMD information systems are functioning in most South American countries, occasional laboratory support is required for a more precise evaluation of the status of the disease in a certain region. The measurement of circulating neutralizing antibodies is not a reliable means of determining FMD status in most South American countries which have regular cattle vaccinations.

A non-structural antigen associated with FMD virus (FMDV) replication was described by Cowan and Graves in 1966 (2). In infected animals this virus-infection-associated antigen (VIA) induces antibodies which are similar in all of the various FMDV types and

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

\*\* Servicio Nacional de Lucha contra la Fiebre Aftosa (SENALFA), Edificio Patria, 4º piso, Asunción, Paraguay.

subtypes. McVicar and Sutmoller (3) suggested the use of an agar-gel double diffusion test for the detection of VIA-antibodies in field surveys. In experiments, this test proved to be highly efficient in detecting and keeping track of infected animals, independent of the development of clinical signs of the disease (4).

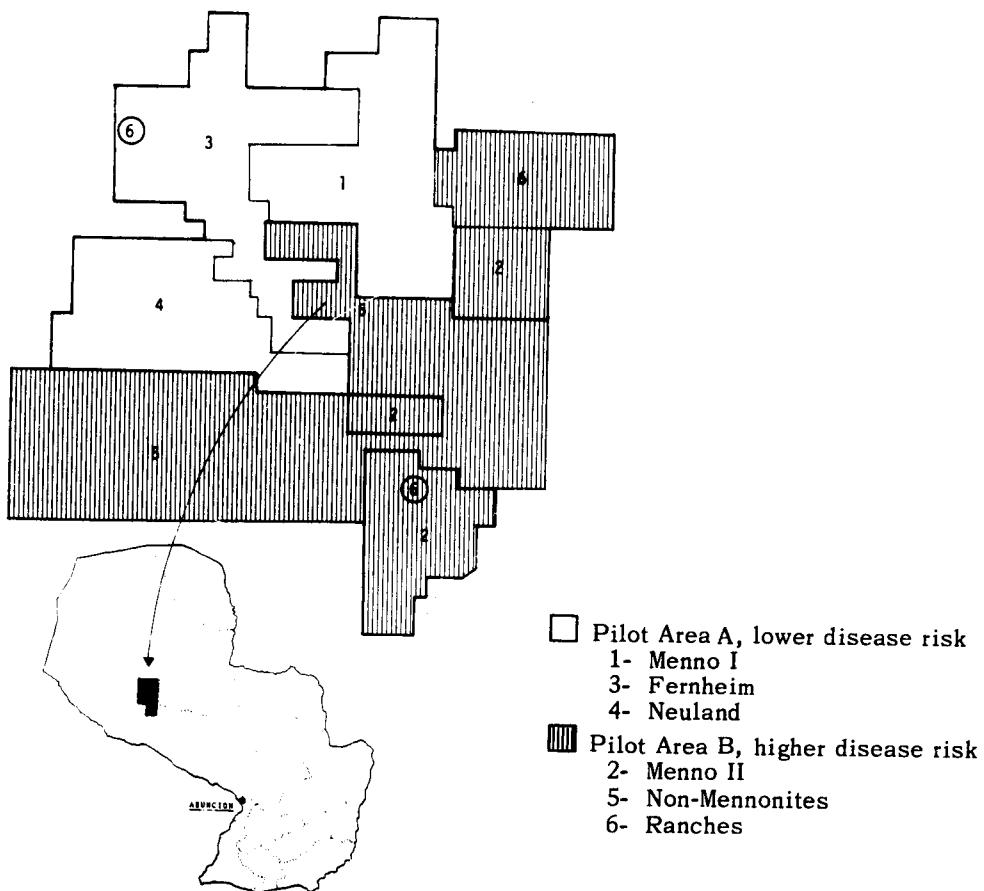
The present work evaluates the usefulness of the VIA test in detecting past FMDV infections in large cattle populations.

#### MATERIALS AND METHODS

The department of Boquerón, Chaco, Paraguay was selected for the survey (Map 1). In July 1973, the survey was carried out, at which time the cattle population was approximately 100.000 head, located in 151 villages and 3 large ranches; and owned by about 1,800 farmers.

In a retrospective survey made in August 1971, nearly 50% of the farmers in the area reported that the disease had never occurred

MAP 1 - *Distribution of the Geo-Political Regiones. Mennonite Colonies. 1973*



on their farms (Alvarez, unpublished data). Between 1966 and 1970, the yearly rate of affected farms appeared not to have exceeded 0.04 (Fig. 1).

An epidemic caused by FMDV subtype O<sub>1</sub> began in May 1971. In August, when the epidemic peaked, cattle in about half the villages and a quarter of the farms were affected by the disease (Figs. 1 and 2).

Until this outbreak there had been no organized FMD control program, although farmers would occasionally vaccinate their cattle.

In January 1972, when the last cases of FMD occurred, the Paraguayan National Service for the Control of Foot-and-Mouth Disease (SENALFA) began two pilot programs for the eradication of the disease in the study area. In both the lower disease risk area (Area A) and the higher disease risk area (Area B), cattle were vaccinated 3 times during the year. After December 1972, no further FMD vaccinations were performed. A commercial vaccine produced in tissue culture and inactivated with acetylethyleneimine (AEI) was used.

FIGURE 1. *Percentage of foot-and-mouth disease-affected herds, by year. Mennonite Colonies. 1966-1973.*

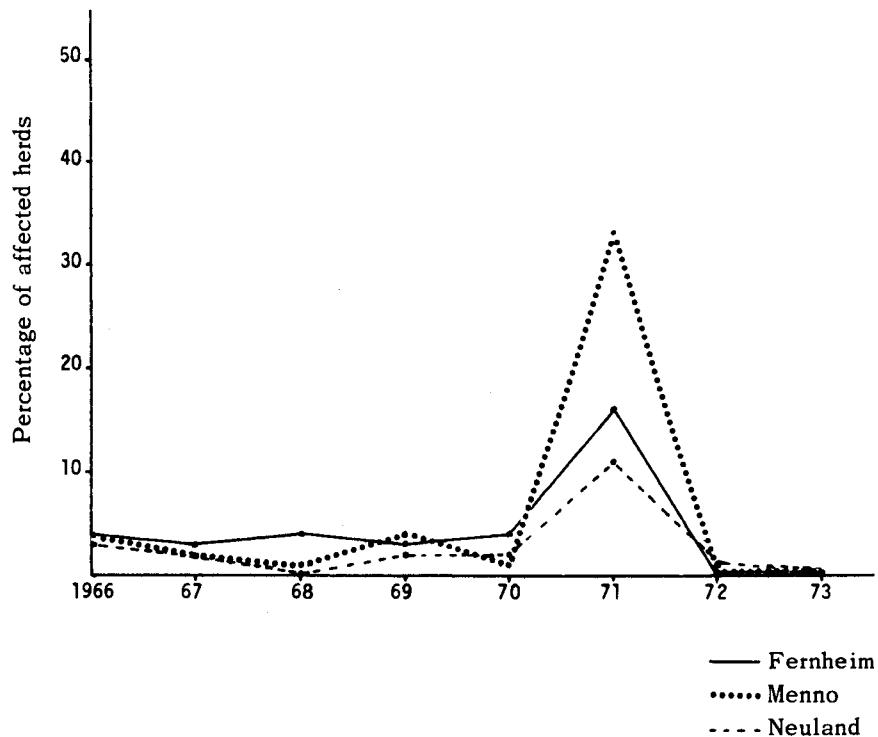
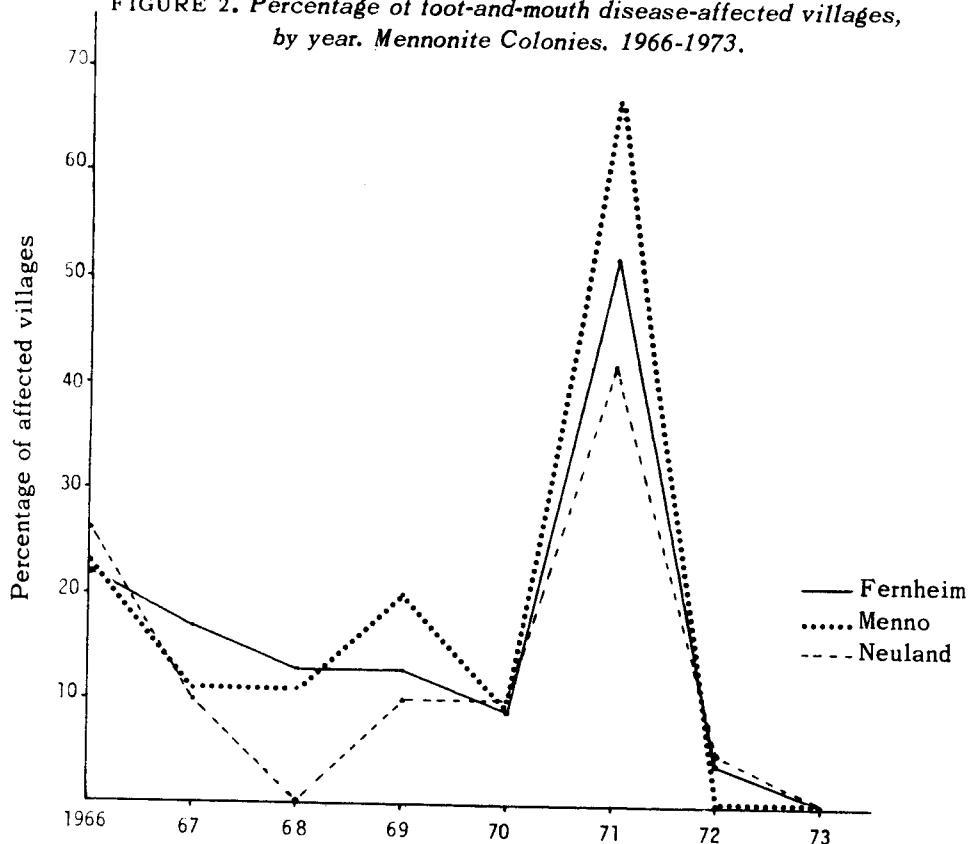


FIGURE 2. Percentage of foot-and-mouth disease-affected villages, by year. Mennonite Colonies. 1966-1973.



#### Selection of the sample

A cluster sample in two stages (5) was selected. Due to the particular sociological pattern of the area, villages were taken as primary sampling units instead of cattle farms. Two variables were used to stratify the sample selection: (a) geographical distribution of the cattle population, and (b) age of cattle (Table 1).

Area A (lower disease risk) was composed of three groups of Mennonite villages: Menno I (No. 1), Fernheim (No. 3), and Neuland (No. 4). Area B (higher disease risk) consisted of two groups of villages, Menno II (No. 2), the non-Mennonite villages (No. 5), and a final group of large ranches (No. 6).

Cattle were divided by age into those over and under 2 years.

#### Serological tests

Blood samples were collected in July 1973, approximately 18 months after the last recorded case of FMD, and again in November 1973 from calves less than 2 years old. Sera were kept at 4° C for 3-10 days and then stored at -20° C until tested.

The agar-gel double diffusion test (3) was used for the detection of VIA-antibodies. The antigen was prepared as reported by Alonso Fernández and Sondahl (6).

#### RESULTS

##### Prevalence of antibodies to VIA

The overall population rate of positive cattle (Table 2) was  $0.26 \pm 0.02$  within 95% confidence limits. Rates in the age division over

two years ( $0.38 \pm 0.02$ , 95%) were significantly higher than those in the younger division ( $0.08 \pm 0.03$ , 95%). The differences between the two age divisions were significant for all areas. The rate of positive cattle in groups 2 and 5 (0.40 and 0.34) was higher than in the remaining areas which ranged between 0.16 and 0.24; and the differences were significant in both age divisions.

In order to determine the association between clinical disease and prevalence rates of antibodies to VIA, the results were analyzed according to whether or not the villages had reported clinical disease in the 1971 survey. A significant association existed be-

tween the reporting of clinical disease in the village and the prevalence rates ( $X^2 = 35.4$  P < 0.001) (Table 3). The  $X^2$  test was significant for both age divisions (under 2 years = 12.88; over 2 years = 28.47).

The results of the prevalence study were also analyzed in terms of the size of animal population in sampled villages, dividing them into those with less than 350 cattle, with 350-950 cattle, and with more than 950 cattle. As can be seen in Table 4, for cattle over 2 years old, the population group of over 950 animals had a significantly higher percentage of positives than the two groups of smaller populations ( $X^2 = 10.7$ ; P < 0.01).

TABLE 1. *Stratification of sampled cattle. Mennonite Colonies, 1973.*

Pilot area	Village group	Population			Sample		
		Villages	Farms	Cattle	Villages	Cattle	
					< 2 years	> 2 years	
A 1 (Meno I)		65	690	28,715	12	189	285
A 3 (Fernheim)		31	432	20,320	9	142	210
A 4 (Neuland)		27	217	13,731	7	112	168
B 2 (Meno II)		19	265	16,329	8	118	194
B 5 (Non-Mennonites)		9	232	18,805	9	128	196
B 6 (Ranches)		3	3	10,000	3	54	94
Totals		154	1,839	107,900	48	743	1,147

TABLE 2. *Number and prevalence rates of positive animals to VIA according to geographical distribution and age divisions. Mennonite Colonies, 1973.*

Village group	Age				Total	
	< 2 years		> 2 years		No.	Rate*
	No.	Rate	No.	Rate		
1	9	0.05	106	0.37	115	0.24 ± 0.04
2	17	0.14	107	0.55	124	0.40 ± 0.05
3	5	0.04	66	0.31	71	0.20 ± 0.04
4	5	0.04	40	0.24	45	0.16 ± 0.04
5	24	0.19	85	0.43	109	0.34 ± 0.05
6	2	0.04	31	0.33	33	0.22 ± 0.07
Total	62	0.08 ± 0.03	435	0.38 ± 0.02	497	0.26 ± 0.02

\* 95% confidence limits.

TABLE 3. *Number and percentage of positive and negative animals to VIA according to age and past FMD clinical experience\*. Mennonite Colonies, 1973.*

	Under 2 years				Over 2 years				Total			
	Positive		Negative		Positive		Negative		Positive		Negative	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
With FMD	34	9	348	91	258	43	337	57	292	30	685	70
Without FMD	4	2	231	98	92	26	263	74	96	16	494	84
Total	38	6	579	94	350	37	600	63	388	25	1179	75

\* Information on clinical history of FMD in village group 5 was not available.

TABLE 4. *Number and percentage of positive and negative animals to VIA by age and size of the bovine population in the villages. Mennonite Colonies, 1973.*

Cattle population in the village	Under 2 years				Over 2 years			
	Positive		Negative		Positive		Negative	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
<350	12	8	147	92			85	36
350 - 950	30	10	276	90			158	33
>950	20	7	260	93			192	44
Total	62	8	683	92			435	38
							711	62

#### DISCUSSION

Since the serological survey was made in July 1973, 18 months after the epidemic, some positive animals could be expected in cattle under 2 years of age. Of the 8 percent positive in this age group (Table 2), many were not yet six months old at the time of bleeding. It is likely that these calves acquired their antibodies to VIA passively; since by November 1973 no VIA was detected in any animals of less than 2 years in 4 of the 6 vil-

lages where VIA-positive calves had been identified 4 months earlier. Some of the positive calves in the other 2 villages could also be accounted for through infection by contact with animals in neighboring areas. Eight calves, 10-18 months old at the time of the survey, had no history of contact with known diseased cattle, but had persisting antibodies to VIA. This could indicate virus transmission from subclinical cases or adult carriers.

Thus, when interpreting results of serological surveys for VIA antibodies, it should be recognized that young animals may have maternal antibodies, although occasional virus transmission from FMDV carriers to newborn calves or older animals may also have occurred. This latter possibility has not yet been proven experimentally.

The AEI-inactivated vaccine used in both pilot areas probably did not cause an increase in the number of positive cattle, since it has a low probability of residual live virus (7).

Village groups 2 and 5 (Area B, lower disease risk) both had higher percentages of positive cattle than the other four groups. Group 6, although also a part of Area B, had a relatively low rate of cattle positive to the VIA reaction, due to the heavy influx of cattle from Area A.

Highly significant differences found between villages groups with and without disease during the 1971 outbreak further support the hypothesis that the differences between the rates of positive cattle are due to varying disease risks. Special reference should also be made to the 26% positive adults in the non-affected villages. These animals may have become affected at the end of the epidemic, although this was not observed (Kaethler, personal communication); they may have had sub-clinical infections, as sometimes occurs even with non-vaccinated cattle (4); or they may have been brought from neighboring infected villages. The last is the most probable, given the frequent and unrecorded movement of cattle within the Mennonite colonies, especially into and out of the large ranches (Group 6). This observation agrees with the significantly higher prevalence rates noted in the larger villages.

#### CONCLUSIONS

VIA antibody surveys in large cattle populations can contribute effectively to epidemiological diagnoses of FMD infections in

areas of South America where control programs are being developed. In order to best utilize the results of such a survey, however, the following parameters should also be considered:

##### *1. Age of the animal population*

Very young animals may carry passive antibodies, although this does not necessarily imply active virus replication. Selecting cattle to be surveyed by age groups is critical for the detection of the last FMD occurrence in the area. The possibility of virus transmission from FMDV carriers to newborn calves or older animals, as Hedger (8) and Augé *et al.* (unpublished data) have suggested, should be studied further.

##### *2. Persistence of VIA antibodies*

A previous study (4) reported that VIA antibodies lasted for at least 15 months post-infection in 5 of 12 infected cattle, regardless of whether or not the animals had developed clinical disease. In the present study, approximately 40% of the animals were positive to the VIA test, even though some of the animals in the Pilot Area may not have been exposed to the virus during the 1971 epidemic. We may assume, then, that antibodies to the VIA persisted much longer in the Chaco study than in the previous one. The cause of this continuing presence of VIA antibodies may lie in differences due to FMD virus strains, the small amounts of polymerase used as a booster in the vaccines, or the frequency of infection. Although in the present survey the population was considered to have had a single infection, it should be kept in mind, when surveying for VIA antibodies in areas without history of the disease, that frequent infections with different types of FMDV will evoke a longer-lasting response.

##### *3. Cattle movement*

Cattle in South America often travel relatively long distances for commercialization.

Any serological survey should therefore include reliable information on cattle turnover and sites of origin of the cattle introduced into the area. Animals coming from areas of high disease incidence will increase the VIA antibody prevalence rate of the population as a whole, without necessarily reflecting actual infection rates in the native cattle.

Surveys for VIA antibody can play an important role in determining the infection rates of large vaccinated cattle populations and may be a useful tool for retrospective epidemiological surveillance. Repeated yearly surveys can be a particularly reliable means of monitoring the progress of FMD control programs.

#### REFERENCES

1. ROSENBERG, F.J.; GOIC M., R.  
Programas de control y prevención de la fiebre aftosa en las Américas. *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 12: 1-22, 1973.
2. COWAN, K.M.; GRAVES, J.H.  
A third antigenic component associated with foot-and-mouth disease infection. *Virology* 30 (4): 528-540, 1966.
3. McVICAR, J.W.; SUTMOLLER, P.  
Foot-and-mouth disease: The agar gel diffusion precipitation test for antibody to virus-infection-associated (VIA) antigen as a tool for epizootiologic surveys. *Am. J. Epidemiol.* 92 (4): 273-278, 1970.
4. ALONSO FERNANDEZ, A.; AUGÉ DE MELLO, P.; GOMES, I.; ROSENBERG, F.J.  
The use of virus-infection-associated antigen (VIA) in the detection of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus. *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 17-18: 17-22, 1975.
5. HENSEN, N.H.; HURWITZ, W.N.; MEDOW, W.G.  
*In "Sample surveys methods and theory"*. Vol. 1, J. Wiley Ed. N. York, 1970.
6. ALONSO FERNANDEZ, A.; SONDAHL, M.S.  
Preparación y concentración de los antígenos 140 S, 12 S y VIA del virus de la fiebre aftosa. *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 17-18: 1-9, 1975.
7. GRAVES, J.H.; ARLINGHAUS, R.B.  
Acetyleneimine in the preparation of inactivated foot-and-mouth disease vaccines. *Proceedings 71 Am. Meeting US Livestock Sanitary Assn.* pp. 396-403, 1967.
8. HEDGER, R.S.  
The isolation and characterization of foot-and-mouth disease virus from clinically normal herds in Botswana. *J. Hig., Camb.* 66 (1): 27-36, 1968.

PRUEBA DE MICRONEUTRALIZACION  
PARA ESTUDIOS DE ANTICUERPOS DE LA FIEBRE AFTOSA

Maria Elma V. Ferreira\*

COMUNICACION BREVE

La prueba de microneutralización (MN) para el virus de la fiebre aftosa fue descrita por Wagner y McVicar (4). Los autores utilizaron las líneas celulares PK15, IB-RS-2 y BHK-21 Clon 13, además de cultivos primarios de tiroides y de riñón de bovino. En el sistema propuesto, después de incubación previa, se mezcló el suero-virus con la suspensión celular y se distribuyó en placas que de inmediato se incubaron a 37° C en estufa de ambiente húmedo, con 5% de CO<sub>2</sub>. Los resultados se basaron en la observación microscópica del efecto citopático a las 48 horas de incubación. Las células BHK-21 demostraron ser las más adecuadas para este sistema.

En los laboratorios de América del Sur donde se trabaja con virus de la fiebre aftosa, incluyendo el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (CPFA), se utiliza la prueba de seroneutralización con cultivos de células en tubos. En este trabajo se proponen algunas modificaciones en la prueba de MN que posibilitan sustituir ventajosamente la prueba de seroneutralización en tubos, principalmente por la economía de material, de tiempo y de mano de obra y además por que permite analizar un número considerablemente mayor de sueros. Tiene las mismas ventajas operativas sobre la prueba de seroprotección en ratón lactante.

Tanto las células BHK-21 Clon 13 (3) como IB-RS-2 (1) cultivadas en monocamadas en botellas de Roux, se trataron con 1% de tripsina a pH 7,7 y después se suspendieron en medio Eagle modificado (3) con 10% de suero bovino. Las suspensiones con 300.000 células por ml se colocaron en las cavidades de las placas\*\* a razón de 0,1 ml y, una vez cubiertas con una tapa de vidrio o de plástico que permite la circulación de aire, se incubaron a 37° C en estufa de CO<sub>2</sub>. Transcurridas 24 horas, las monocamadas de células estaban aptas para ser utilizadas.

Se usaron las cepas de virus de la fiebre aftosa O<sub>1</sub> Campos, A<sub>24</sub> Cruzeiro y C<sub>3</sub> Resende. Las suspensiones virulentas correspondientes al 4º pasaje en células BHK-21, después de ser clarificadas por centrifugación y tituladas, se diluyeron en medio Eagle modificado. En seguida se distribuyeron en ampollas con 2 ml y se conservaron a -70° C hasta el momento del uso. Cada ml de suspensión contenía suficiente cantidad de virus para que, con apenas una dilución, se pudiesen realizar todas las pruebas de un día de trabajo.

\*\* Placa de microprueba FALCON 3040.

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

Los experimentos se realizaron con sueros de bovinos vacunados, no vacunados o convalecientes de fiebre aftosa, conservados a -20° C e inactivados a 56° C durante 30 minutos.

Las pruebas MN se realizaron mezclando 0,5 ml de suero en diluciones al doble con 0,5 ml de una suspensión virulenta que contenía aproximadamente 1.000 DICC<sub>50</sub>. Como diluyente se utilizó medio Eagle modificado con 250 U de penicilina, 25 mg de estreptomicina y 25 mg de Fungizona\* por ml. El pH 7,2 del medio (2) con una solución 28 mM de tampón HEPES\*\*. La mezcla suero-virus se incubó a 37° C durante 1 hora.

El medio de crecimiento de las células se eliminó invirtiendo las placas y secándolas con papel absorbente. A continuación, en cada cavidad se colocó 0,1 ml de la mezcla suero-virus que contenía aproximadamente 100 DICC<sub>50</sub> y después de tapadas se mantuvieron en la estufa de CO<sub>2</sub>. Transcurridas 48 horas, las placas se sumergieron durante 15 minutos en una solución acuosa con 5% de formalina y 0,1% de cristal violeta para fijar y teñir las células (Fig. 1).

La lectura se realizó por observación directa de las placas, después de enjuagadas con agua corriente. La dilución del suero que protegió 50% de las monocamadas, se calculó por el método de Spearman-Kärber.

No se observaron diferencias de títulos del virus entre las dos líneas de células estudiadas. Sin embargo, la lectura de la prueba fue más fácil cuando se utilizaron células IB-RS-2, por presentar mayor desprendimiento de la monocamada celular cuando hubo replicación del virus (Fig. 1). Por este motivo, se seleccionaron las células IB-RS-2 para pruebas de rutina. Además, estas células pueden ser cultivadas en medio Earle que es de bajo costo y que está al alcance de laboratorios con pocos recursos.

\* Squibb.

\*\* N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethanesulfonic Acid.

El uso de monocamadas de células pre-formadas permitió reproducir con mayor fidelidad los resultados que con el método propuesto por Wagner y McVicar. Probablemente esto se debe a que las monocamadas pre-formadas presentan más uniformidad y se eliminan variaciones que pueden ocurrir en las primeras horas de formación de la monocamada celular. El empleo del tampón HEPES se considera importante para lograr resultados reproducibles ya que estabiliza el pH durante el período crítico de las primeras horas cuando se pegan las células y se forman las monocamadas.

También influye favorablemente la utilización de un virus que se conserva a -70° C y del cual, partiendo de una ampolla en una sola operación se prepara la dilución que se necesita para una jornada de trabajo.

La posibilidad que ofrece esta prueba de reproducir los resultados se estudió a través de un experimento con 14 sueros bovinos en los que para cada suero se repitió 5 veces la determinación del título de anticuerpos. En cada titulación se utilizaron 6 orificios por dilución. En estas condiciones se tiene una probabilidad de 95% de que una determinación cualquiera varíe alrededor del valor real en ±0,22 para los virus O<sub>1</sub> y C<sub>3</sub> y en ±0,35 para el virus A<sub>24</sub>.

No se observaron diferencias significativas en los títulos de los sueros examinados con dosis de virus que variaron de 50 a 200 DICC<sub>50</sub>. También se comprobó que la media para una confianza de 95% del número de DICC<sub>50</sub> durante 6 meses fue de 118±22, 100±18 y 135±22 para los tipos O, A y C respectivamente.

Sin embargo, se demostró que los títulos de los virus eran por lo menos dos veces más bajos cuando se utilizaron células recién retiradas de nitrógeno líquido y con pocos pasajes. Para tal motivo, las células nuevas fueron pasadas 5 ó 6 veces antes de realizar la prueba para lograr que el virus alcance al título previsto.

La formación de pequeñas placas producidas por algunas cepas del virus de la fiebre aftosa no interfirió en las lecturas (Fig. 1 b).

La prueba MN descrita en este trabajo no necesita de equipo especial, con excepción de una estufa de CO<sub>2</sub> y de placas de microprueba. A pesar de que las placas son descartables, pueden ser usadas varias veces, lo que compensa su precio elevado. No obstante, su lavado debe hacerse con mucho cuidado, teniendo la precaución de no rayar el

fondo de las cavidades.

Aún son necesarios mayores estudios para comprobar la sensibilidad y especificidad de esta prueba en relación con el estado inmunitario de los bovinos. Sin embargo, con el conocimiento adquirido en nuestros ensayos es posible obtener rápida información sobre el comportamiento de la vacuna antiaftosa a nivel de campo y realizar muestreos con centenas de sueros para vigilancia epidemiológica.

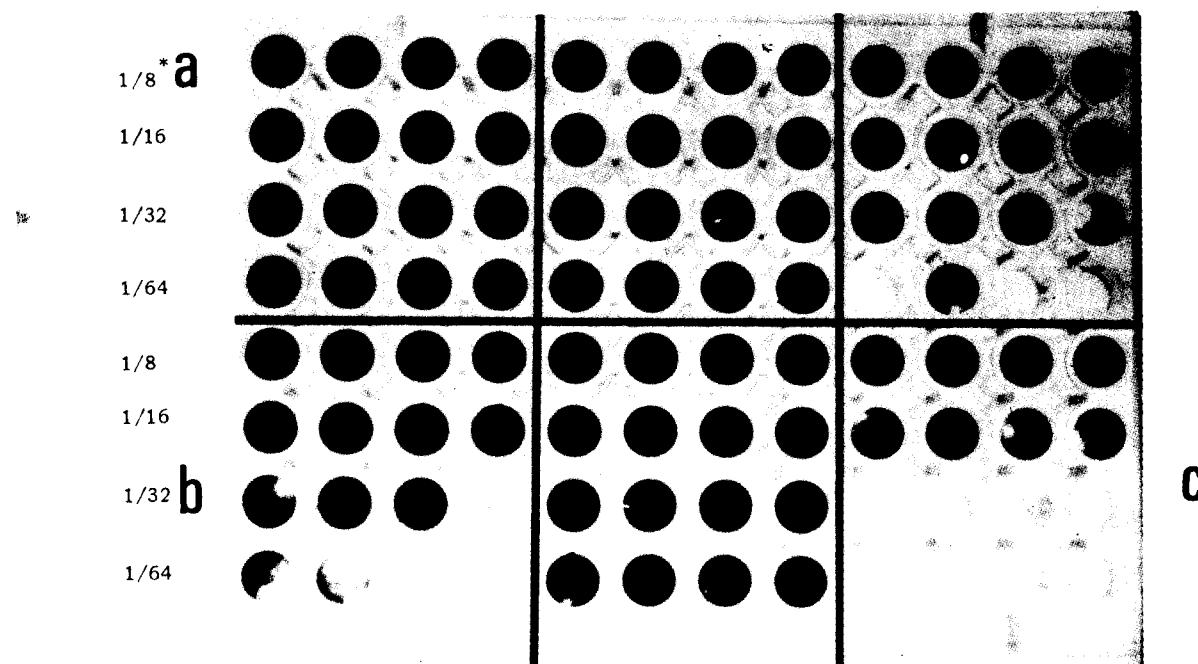


FIGURA 1. Prueba de microneutralización con células IB-RS-2. La utilización de 4 diluciones por suero y 4 orificios por dilución permite el estudio de 6 sueros. a) La presencia de monocamadas totalmente coloreadas indica la existencia de suficientes anticuerpos para neutralizar 100 DICC<sub>50</sub>; b) formación de placas visibles, y c) el desprendimiento total de células indica la ausencia de anticuerpos.

\* Dilución del suero.

**A GRADECIMIENTOS**

La autora agradece al Dr. Paul Sutmöller por su estímulo para que llevara a cabo este trabajo y al Dr. Vicente Astudillo por haber realizado el análisis estadístico.

**REFERENCIAS**

1. CASTRO, Maria Pereira de.  
Clonal variation in the swine kidney cell line, IB-RS-2 in relation to morphology, karyotype and susceptibility to the foot-and-mouth disease virus (FMDV). *Arq. Inst. Biol., S. Paulo*, 37 (2): 103-127, 1970.
2. HALLIBURTON, B.S.; BECKER, M.E.  
The use of HEPES buffer in micro-tissue culture plates for routine enterovirus diagnosis. *Health Lab. Science* 8 (3): 155-159, 1971.
3. MACPHERSON, I.; STOKER, M.  
Polyoma transformation of hamster cell clones - an investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virology* 16 (2): 147-151, 1962.
4. WAGNER, G.G.; McVICAR, J.W.  
Foot-and-mouth disease virus antibodies. Comparison of a tissue culture microneutralization test with the assay in suckling mice. *Appl. Microbiol.* 20 (6): 995-997, 1970.

MICROTITER NEUTRALIZATION TEST  
FOR THE STUDY OF FOOT-AND-MOUTH DISEASE ANTIBODIES

Maria Elma V. Ferreira\*

BRIEF REPORT

A microneutralization test (MNT) for foot-and-mouth disease (FMD) virus was described by Wagner and McVicar (4). The authors used PK15, IB-RS-2 and BHK-21 clone 13 cell lines as well as primary cultures of bovine thyroid and kidney cells. In their system, virus-serum mixtures were incubated in tubes, cells were added to these mixtures and the suspension distributed over the wells of disposable plates. The plates were incubated at 37° C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> and then read microscopically for cytopathic effects after 48 hours of incubation. BHK-21 cells were found to be the most suitable for this system.

In South American FMD laboratories, including the Pan American Foot-and-Mouth Disease Center (PAFMDC), the serum neutralization test in tubes is used routinely. In this paper we propose some changes in the MNT which make it possible for it to replace the tube test and save considerably on materials, time and labor. The MNT also allows for the testing of larger number of sera than has been possible with the tube test. It will have similar advantages over the mouse protection test.

For the MNT, BHK-21 clone 13 (3) or IB-RS-2 (1) cell cultures were dispersed with 1% trypsin (pH 7.7) and suspended in modified

Eagle medium (MEM) (3), with 10% bovine serum. Cell suspensions containing 300,000 cell/ml were distributed in 0.1 ml volumes over the wells of disposable microtiter plates\*\*, which were covered with glass plates to allow air circulation. The plates were incubated at 37° C in a CO<sub>2</sub> incubator. After 24 h, the monolayer cells were ready for use.

FMD virus strains O<sub>1</sub> Campos, A<sub>24</sub> Cruzeiro and C<sub>3</sub> Resende were used in the 4th BHK-21 cell passage. The virus suspensions in MEM had previously been clarified by centrifugation and titrated and stored in 2 ml portions at -70° C. Each portion contained sufficient virus to produce in a one-step dilution the virus suspension needed for a daily test run.

Sera from vaccinated, non-immunized or convalescent cattle were stored at -20° C. They were inactivated at 56° C for 30 min before being tested.

The MNT were made by mixing 0.5 ml of serum dilutions with an equal volume of the virus suspension containing an estimated 1,000 CCID<sub>50</sub>. All dilutions of serum and virus were made in MEM with 250 IU of Penicillin, 25 mg of streptomycin and 25 mg of

\*\* Microtiter Plate FALCON 3040.

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

Fungizon\*. The pH of the medium (2) was adjusted to 7.2 with a solution of 28 mM of HEPES\*. The serum-virus mixtures were kept at 37° C for 1 h.

The growth medium was removed from the plates by inverting and vigorously shaking the plate. The surface was dried with commercial paper tissue. The virus-serum mixtures were then distributed in 0.1 ml volumes containing 100 CCID<sub>50</sub> over the wells of the plate, which were again covered with glass plate and further incubated for 48 h in a CO<sub>2</sub> incubator. After that period the cultures were fixed and stained by submersion during 15 min in a solution of 5% formalin with 0.1% crystal violet (Fig. 1).

After rinsing with tap water the plates were dried and ready for macroscopic reading. The dilution which protected 50% of the monolayers was calculated by the method of Spearman-Kärber.

No difference in virus titers was observed between BHK-21 and IB-RS-2 cells, but with IB-RS-2 cells the reading of the positive or negative wells was easier, because of more extensive disruption of the cell layer with virus replication (Fig. 1). For this reason IB-RS-2 cells were preferred for routine tests. Moreover, these cells can be grown at low cost in Earle's medium which is available to laboratories with limited resources.

The use of pre-formed monolayers allowed for a better reproducibility of results than the method described by Wagner and McVicar, probably because the pre-formed monolayers were more uniform and those variables eliminated which occur during the first hours of monolayer formation. The use of HEPES buffer is likely an important factor in the reproducibility of results since it stabilizes the pH during the critical hours of cell attachment and initiation of the monolayers.

---

\* Squibb.

\*\* N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethanесulfonic Acid.

Another important factor for obtaining reproducible results is the use of a virus stock stored at -70° C which can be diluted in one-step to prepare the virus suspension needed for each daily test run.

The reproducibility of the MNT was established by a series of tests with 14 cattle sera. Five replicate tests were made from each serum using 6 wells per dilution. Under these conditions a 95% probability exists that the result will vary from the true value by  $\pm 0.22$  for viruses O<sub>1</sub> and C<sub>3</sub>, and  $\pm 0.35$  for virus A<sub>24</sub>.

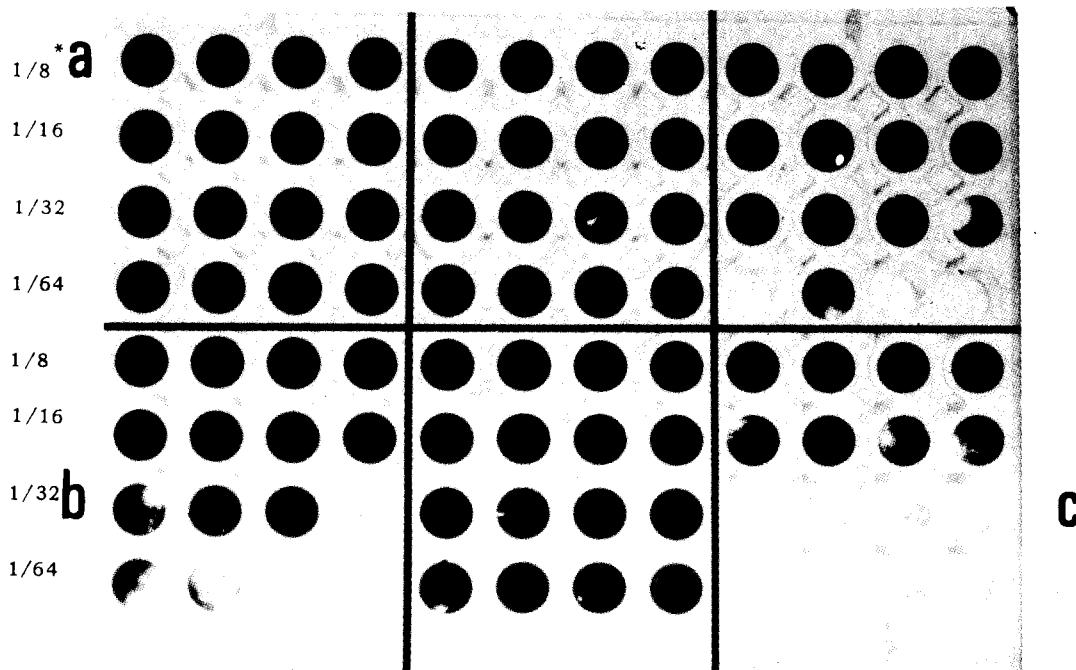
No significant differences were observed in serum titers with virus doses varying between 50 and 200 CCID<sub>50</sub>. It was also shown that the mean virus dose during the 6-month test period was 118 $\pm$ 22, 100 $\pm$ 18 and 135 $\pm$ 22 for types O, A and C, respectively, with a 95% confidence limit.

However, virus titers proved to be reduced by at least 50% when cells were used which had recently been grown from stock stored in liquid nitrogen. Therefore such cultures were always given 5-6 passages before use in the MNT and never until normal virus titers were obtained.

No major problems were encountered with the reading of plates when small-plaque-forming viruses were used (Fig. 1 b).

The MNT described in this paper does not require any special equipment except for a CO<sub>2</sub> incubator and microtiter plates. Even though the plates are disposable, they can be reused several times. However, they must be cleaned carefully, without scratching the bottom of the well.

Further studies are needed to determine the sensitivity and specificity of the MNT in relation to the immune status of cattle. However, the experience to date with the test shows that it is possible to obtain information quickly regarding the value of vaccines used in the field and to carry out serological surveys on large numbers of sera.



**FIGURE 1.** Microneutralization test with IB-RS-2 cells. Four dilutions of sera were used divided over 4 wells, permitting the assay of 6 sera per plate. a) The presence of a stained complete cell sheet indicates the existence of sufficient antibodies to neutralize 100 CCID<sub>50</sub>; b) plaque formation, and c) total disruption of the cell sheet indicating the absence of antibodies.

\* Serum dilution.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The author wishes to thank Dr. Paul Sutmöller for his stimulation and support and Dr. Vicente Astudillo for the statistical analysis.

#### REFERENCES

1. CASTRO, Maria Pereira de  
Clonal variation in the swine kidney cell line, IB-RS-2 in relation to morphology, karyotype and susceptibility to the foot-and-mouth disease virus (FMDV). *Arq. Inst. Biol., S. Paulo*, 37 (2): 103-127, 1970.

2. HALLIBURTON, B.S.; BECKER, M.E.  
The use of HEPES buffer in micro-tissue culture plates for routine enterovirus diagnosis.  
*Health Lab. Science* 8 (3): 155-159, 1971.
3. MACPHERSON, I.; STOKER, M.  
Polyoma transformation of hamster cell clones - an investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virology* 16 (2): 147-151, 1962.
4. WAGNER, G.G.; McVICAR, J.W.  
Foot-and-mouth disease virus antibodies. Comparison of a tissue culture microneutralization test with the assay in suckling mice. *Appl. Microbiol.* 20 (6): 995-997, 1970.

**PRUEBA DE NEUTRALIZACION POR REDUCCION DE PLACAS  
PARA LA EVALUACION DE ANTICUERPOS CONTRA LA FIEBRE AFTOSA**

P. Augé de Mello\*

**COMUNICACION BREVE**

[La prueba de neutralización por reducción de placas (NRP) para estudios en fiebre aftosa fue descrita por McVicar *et al.* (4). Utilizaron cultivos secundarios de células de riñón bovino, con 6 días de incubación, cultivados en placas plásticas descartables y, como "overlay", 0,6% de goma Tragacanth (5). Veinte horas después de la inoculación de la mezcla muestra-virus, contenido 40-50 unidades formadoras de placas (UFP) del virus de la fiebre aftosa, las células fueron fijadas y teñidas y el resultado expresado como el log de la recíproca de la dilución de la muestra que neutralizaba 73% de las UFP.

Las células BHK-21 Clon 13 e IB-RS-2 con "overlay" de agar han sido utilizadas durante varios años en los trabajos de rutina del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (CPFA). Con el inicio de los estudios epidemiológicos, que incluyen grandes cantidades de muestras, fue necesario introducir técnicas más prácticas y que permitiesen resultados más rápidos.]

La NRP fue adaptada a las facilidades de nuestros laboratorios para alcanzar ese objetivo. La utilización de las células IB-RS-2 cultivadas en placas de vidrio montadas en cajas de aluminio y el uso de gomas disponibles en el mercado local tornó posible su aplicación en forma de rutina para estudios epidemiológicos de acuerdo con nuestras condiciones.

Células IB-RS-2 Clon 17 (1) fueron cultivadas en placas de Petri 15 x 60 mm. Cada placa fue sembrada con  $1,2 \times 10^6$ ,<sup>0</sup> células con 6 ml de medio Eagle modificado (2) conteniendo 10% de suero bovino inactivado. Las placas fueron montadas en cajas de aluminio especialmente confeccionadas para contener 6 fondos o 4 tapas (Figs. 1 y 2). La incubación se hizo en atmósfera humidificada y con 5% de CO<sub>2</sub>, a 37° C durante 48 horas.

Las muestras en estudio, previamente inactivadas a 56° C por 30 min (suero bovino o material esofágico-faríngeo) fueron diluidas, en serie, en medio Eagle modificado conteniendo 28 mM de ácido N-2 hydroxyethyl-piperazine-N'2 ethane-sulfonic (HEPES). Para cada dilución de la muestra se adicionó igual cantidad de suspensión de virus de tal forma que la mezcla muestra-virus contenía 50-60 UFP por 0,1 ml. La mezcla muestra-virus se incubó en bañomaría durante 30 min a 37° C.

Retirado el medio de cultivo de las células, la dilución correspondiente muestra-virus fue inoculada en cantidad de 0,1 ml por placa de Petri y el contacto virus-célula se mantuvo durante 30 min en estufa CO<sub>2</sub> a 37° C con movimiento ocasional para redistribución del inóculo.

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

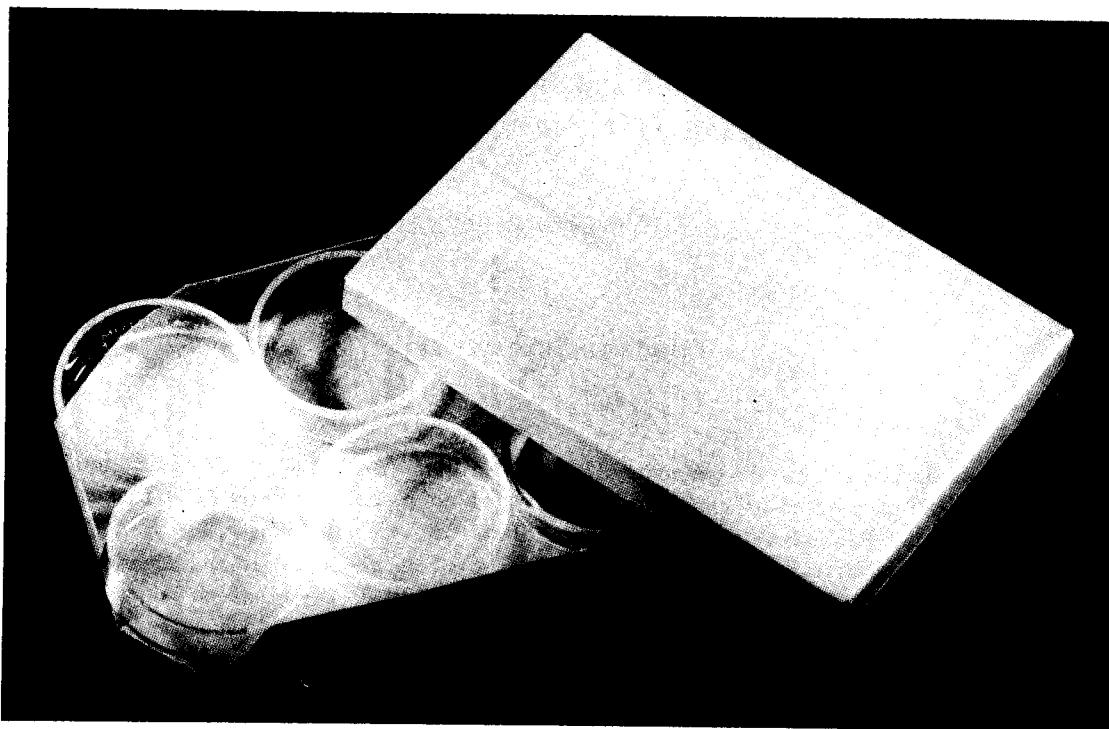


FIGURA 1. Caja de aluminio confeccionada para contener 6 fondos.

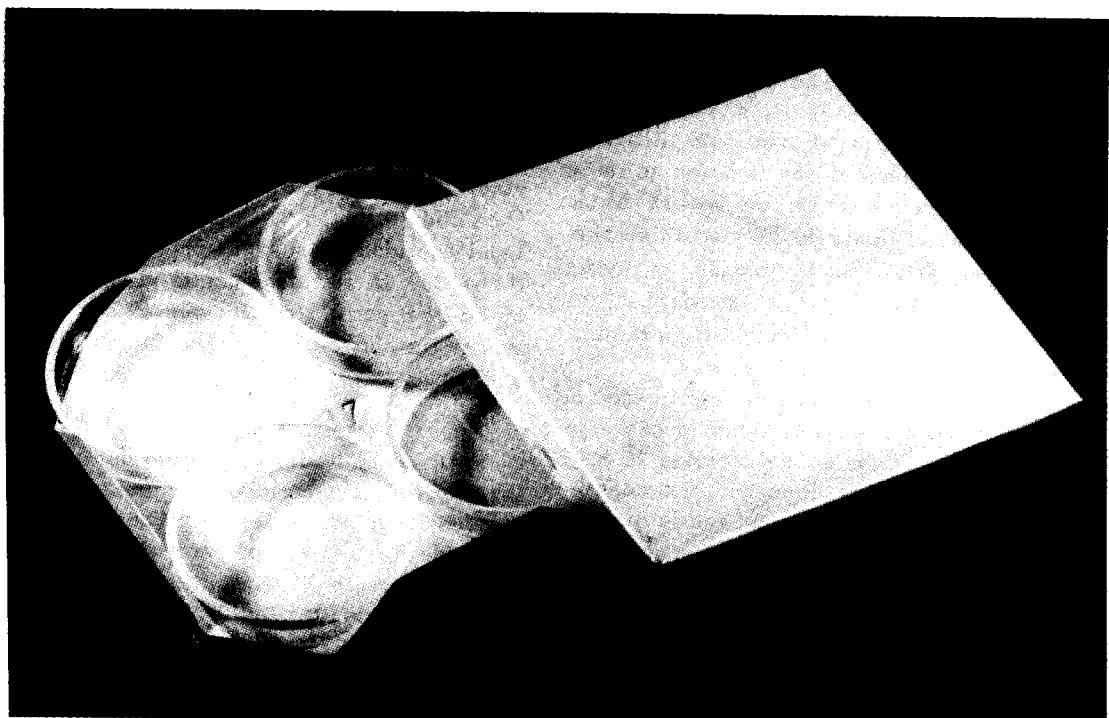


FIGURA 2. Caja de aluminio confeccionada para contener 4 tapas.

Fueron utilizados dos tipos de goma encontrados en el mercado local con los nombres de Adragante\* y Karaya\*\* (3). La preparación de las gomas para ser usadas como "overlay" se hizo de la siguiente forma:

#### Goma Adragante

La goma adragante se preparó a la concentración de 2,5% (p/v) disolviendo el polvo, con fuerte agitación, en agua desmineralizada previamente calentada a 50° C. Una vez formada una solución coloidal de aspecto homogéneo, se adicionaron 2,5 ml de rojo de fenol a 1% (p/v) por litro de solución y enseguida se llevó al autoclave a 120° C durante 20 min. Después de la esterilización la solución fue conservada a 4° C. En el momento de uso la goma fue pre-calentada a 37° C, agregándose igual cantidad de medio Earle 2 x concentrado contenido 500 U.I. de penicilina, 1 mg de estreptomicina y 5,0 mg de Fungizona por ml.

#### Goma Karaya

La goma karaya se preparó al 2% (p/v) en agua desmineralizada de la misma forma descrita para la goma adragante. En el momento de uso y después de haberle adicionado igual cantidad de medio Earle 2 x concentrado contenido antibióticos, el pH de la solución fue ajustado a 7,4-7,6 por medio de NaHCO<sub>3</sub> a 7,5%, necesitando agregar aproximadamente 10% de NaHCO<sub>3</sub> para alcanzar el pH deseado.

La goma (adragante o karaya) se depositó en cantidad de 3 ml por placa y enseguida incubada en estufa durante 24 horas a 37° C en atmósfera humidificada y con 5% de CO<sub>2</sub>. Durante ese período se tuvo la precaución de no mover las placas de Petri para evitar la

formación de placas "cometas" como se puede ver en la Fig. 4 arriba y a la derecha.

Transcurrido el período de incubación, las células fueron fijadas por 30 min con una solución de formol a 20%, lavadas en agua corriente y teñidas durante 10 min con cristal violeta a 0,5% en una solución de alcohol etílico a 20% en agua destilada. El colorante fue recuperado y las células lavadas en agua corriente.

Después de la lectura de las placas los resultados se expresaron en porcentaje de neutralización de las UFP calculado según fue descrito por McVicar *et al.* (4): 1) cálculo del % de reducción del número de las UFP en cada dilución de la muestra; 2) transformación de los porcentajes en probits; 3) cálculo de la línea de regresión de los probits; 4) cálculo del título de la muestra sobre la base del 73% de reducción de las UFP. En nuestro caso optamos por 70%.

Los resultados obtenidos con las gomas adragante y karaya en las concentraciones de 1,25% y 1% respectivamente fueron similares. No se observaron señales de toxicidad para las células IB-RS-2 las que siempre presentaron buen aspecto y sobrevivieron más tiempo cuando fueron comparadas con las de "overlay" estándar de agar. Por otro lado, la utilización de estas células con "overlay" de goma permitió que el virus de la fiebre aftosa formara placas bien definidas en solamente 24 horas (Figs. 3 y 4), lo que no ocurre con las células BHK-21 Clon 13. Además, los títulos obtenidos, comparados con los de agar, fueron siempre iguales o superiores y por esa razón pasamos a utilizarla para las titulaciones de virus de la fiebre aftosa en forma rutinaria.

El uso de bandejas de aluminio para montaje de las placas de Petri aumentó el rendimiento de las placas, simplificó el trabajo y permitió un mejor aprovechamiento de la capacidad útil de las estufas de CO<sub>2</sub>.

\* Adragante es lo mismo que Tragacanth - goma derivada de varias especies de la planta *Astragalus*.

\*\* Karaya - goma derivada de varias especies de la planta *Sterculia*.

Con las modificaciones introducidas fue posible adaptar la prueba de NRP para uso en rutina como también utilizarla en titulaciones de virus de la fiebre aftosa de modo práctico y económico, con lectura en sólo 24 horas.

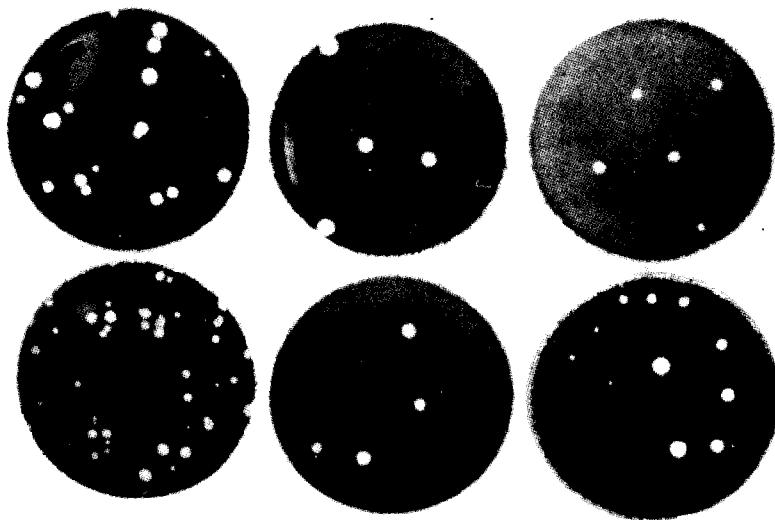


FIGURA 3. Placas producidas por el virus de la fiebre aftosa tipo O en las células IB-RS-2 con "overlay" de goma en 24 horas de incubación.

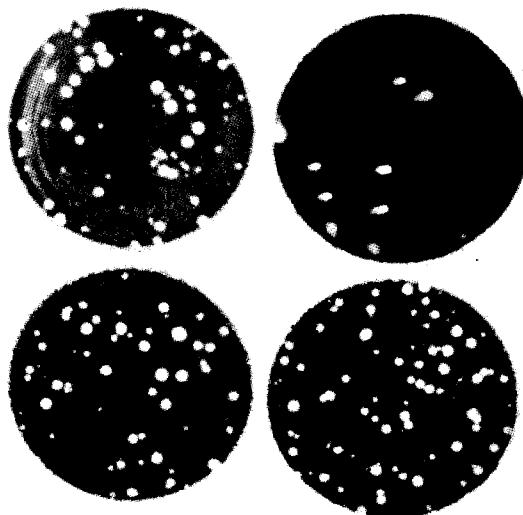


FIGURA 4. Placas producidas por el virus de la fiebre aftosa tipo O en las células IB-RS-2 con "overlay" de goma en 24 horas de incubación; en la placa superior derecha se observa el desarrollo de "cometas".

## AGRADECIMIENTOS

El autor agradece al Dr. Paul Sutmoller por sugerir el presente trabajo y al Sr. Pedro J. Vieira por la asistencia técnica prestada.

## BIBLIOGRAFIA

1. CASTRO, Maria Pereira de.  
Clonal variation in the swine kidney cell line, IB-RS-2 in relation to morphology, karyotype and susceptibility to the foot-and-mouth disease virus (FMDV). *Arg. Inst. Biol.*, S. Paulo 37 (2): 103-127, 1970.
2. MACPHERSON, I.; STOCKER, M.  
Polyoma transformation of hamster cell clones - An investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virology* 16: 147-151, 1962.
3. MANTEL, C.L.  
"The water soluble gum". Reinhold, New York, 1947.
4. McVICAR, J.W.; SUTMOLLER, P.; ANDERSEN, A.A.  
Foot-and-mouth disease virus: plaque reduction neutralization test. *Arch. ges. Virusforsch.* 44 (2): 163-172, 1974.
5. MIRCHAMSY, H.; RAPP, F.  
A new overlay for plaquing animal virus. *Proc. Soc. exp. Biol.*, N. York 29 (1): 13-17, 1968.

PLAQUE REDUCTION NEUTRALIZATION TEST FOR THE  
ASSAY OF ANTIBODIES AGAINST FOOT-AND-MOUTH DISEASE

P. Augé de Mello\*

BRIEF REPORT

The plaque reduction neutralization (PRN) test for the study of foot-and-mouth disease was described by McVicar *et al.* (4). They used secondary bovine kidney cell cultures grown for 6 days in disposable plastic plates and an overlay of 0.6% Tragacanth<sup>®</sup> gum (5). Twenty hours after the culture was inoculated with 40-50 plaque-forming-units (PFU) of the virus, the cells were fixed and stained and the results expressed as the log of the reciprocal of the dilution which neutralized 73% of the plaques.

Cultures of BHK-21 C 13 and of IB-RS-2 cells with agar overlay have been used for several years in the routine work at the Pan American Foot-and-Mouth Disease Center (PAFMDC). With the start of epidemiological studies which required testing of large numbers of samples it became necessary to introduce more practical plaque techniques which would give faster results.

For this reason PRN was adapted to our laboratory facilities. IB-RS-2 cells were cultivated in glass Petri-dishes mounted in aluminum trays and locally obtained gums for overlay made it possible to apply this test routinely to epidemiological studies under our conditions.

IB-RS-2 Clone 17 (1) cells were seeded with  $1.2 \times 10^{6.0}$  cells and grown in Petri-dishes of 15 x 60 mm in 6 ml of modified Eagle medium (2) containing 10% inactivated bovine serum. The Petri-dishes were mounted in aluminum trays specially constructed so that each one could hold 6 bottoms of Petri-dishes or 4 covers (Figs.1 and 2). The cultures were incubated in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37° C for 48 hours.

The samples under study were previously inactivated at 56° C for 30 min (bovine serum or esophageal-pharyngeal material) and serially diluted in modified Eagle medium containing 28 mM of N-2 hydroxyethyl-piperazine-N'2 ethane-sulfonic (HEPES). To each dilution an equal quantity of virus suspension was added, so that each mixture contained 50-60 PFU's per 0.1 ml. The virus-sample mixtures were incubated in a water-bath for 30 min at 37° C.

The medium of the cultures was removed and the cultures inoculated with the corresponding virus-sample mixture in a quantity of 0.1 ml per Petri-dish. After inoculation the cells were left for 30 min in a CO<sub>2</sub> incubator at 37° C with occasional redistribution of the inoculum.

---

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

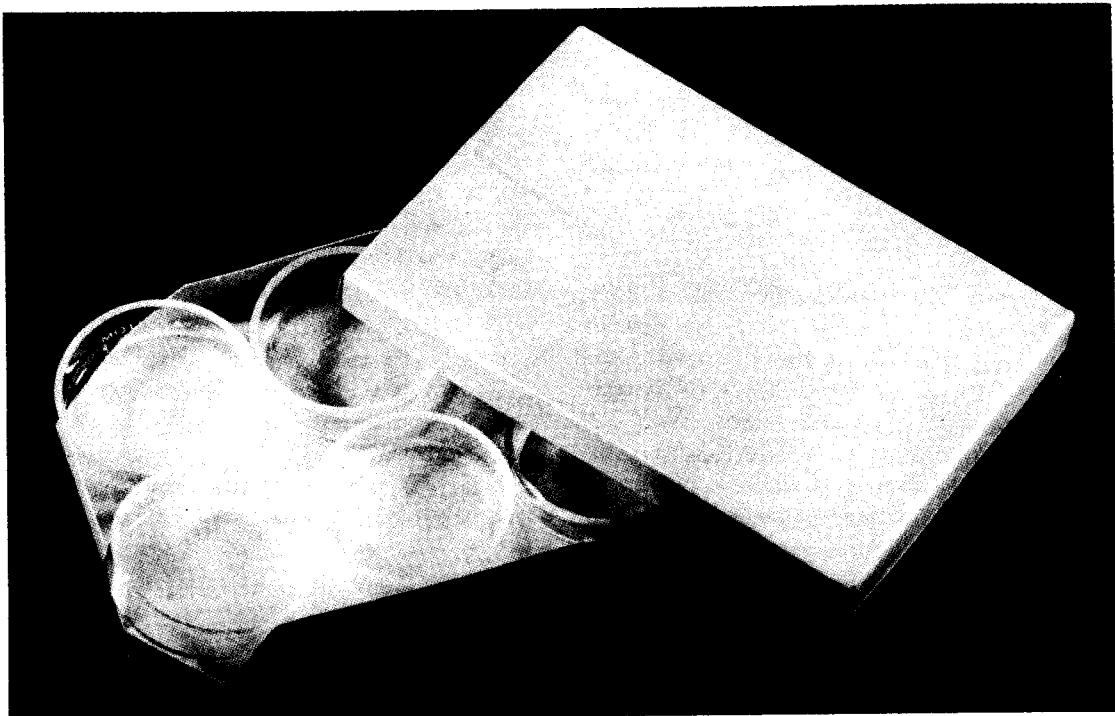


FIGURE 1. Aluminum tray designed to hold 6 Petri dish bottoms.

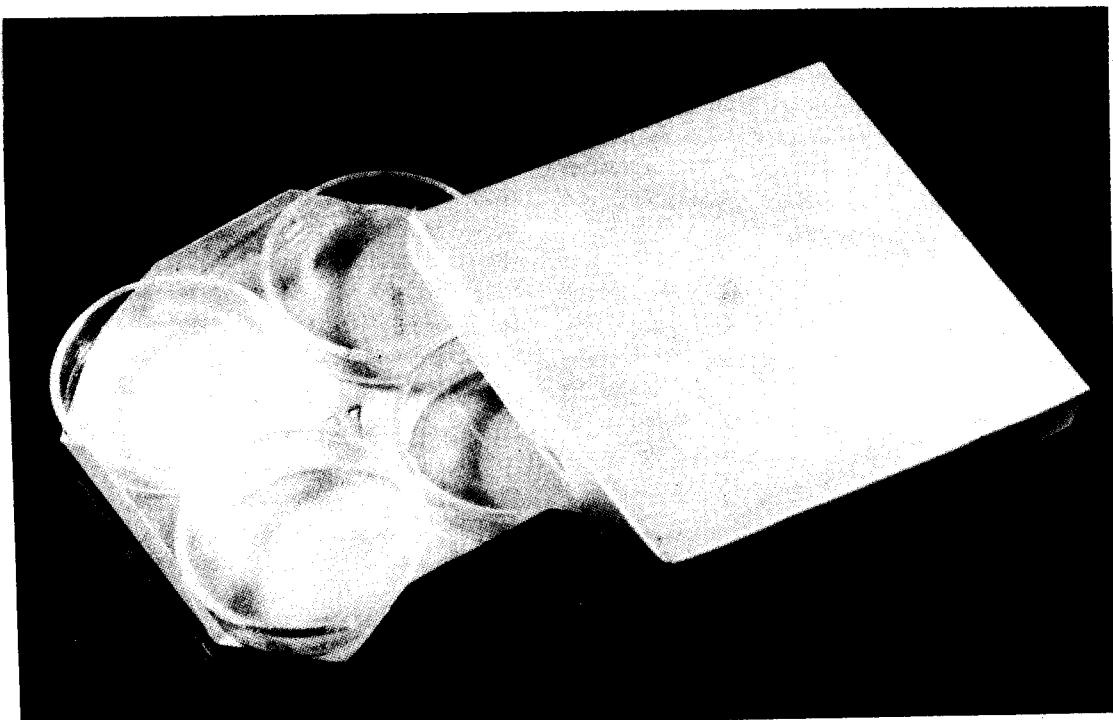


FIGURE 2. Aluminum tray designed to hold 4 Petri dish lids.

Two types of gum were found on the local market: Adraganth\* and Karaya\*\* (3). These gums, to be used as overlay, were prepared as follows:

#### *Adraganth gum*

Adraganth gum was prepared in a 2.5% (w/v) concentration, dissolving the powder under strong agitation in demineralized water previously heated to 50° C. Once a homogeneous colloidal suspension was formed, 2.5 ml of fenol red at 1% (w/v) per liter of solution were added. The gum was autoclaved at 120° C for 20 min and then stored at 4° C. At the moment of use the gum was pre-heated to 37° C, after adding an equal amount of double concentrated modified Earle's medium with 500 I.U. penicillin, 1 mg of streptomycin and 5.0 mg of fungizon per ml.

#### *Karaya gum*

Karaya gum was prepared at 2% (w/v) in demineralized water in the same form as described for the adraganth gum. Just before use, an equal quantity of double concentrated modified Earle's medium with antibiotics added and the pH adjusted to 7.4-7.6 by means of a 7.5% solution of NaHCO<sub>3</sub>. The addition of approximately 10% of NaHCO<sub>3</sub> was required to reach the desirable pH.

The gum (adraganth or karaya) was added in 3 ml quantities to each Petri-dish and then incubated for 24 hours at 37° C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. During that period it was necessary not to move the Petri-dishes in order to prevent the formation of "comet" plaques, as seen in Fig. 4, upper right plate.

After incubation, the cell cultures were fixed for 30 min in a solution of 20% formal and rinsed in tap water and stained for 10 min with a violet crystal 0.5% solution in 20% ethyl alcohol in distilled water. The stained solution was recovered and cells washed in tap water.

Plaques were counted and the results expressed as the percentage of neutralization with titers calculated as described by McVicar et al. (4): 1) calculation of the percentage of plaque reduction in each dilution of the sample; 2) transformation of the percentages into probits; 3) calculation of the regression lines of the probits; and 4) calculation of the titers of the sample on the basis of 73% plaque reduction. For our test 70% reduction was used.

The results obtained with adraganth and karaya gums in concentrations of 1.25% and 1%, respectively, were similar. There were no signs of toxicity with the IB-RS-2 cells, which always had a healthy appearance and survived longer when compared with those under a standard agar overlay. With IB-RS-2 cells under gum overlay well-defined plaques were formed by FMD virus in only 24 hours (Figs. 3 and 4); this did not occur with the BHK-21 C 13 cells. The virus titers obtained, when compared to agar, were always similar or higher and for that reason we adopted the gum overlay for routine virus titrations.

The use of aluminum trays to mount the Petri-dishes doubled the number of available dishes, simplified the work and permitted better use of the CO<sub>2</sub> incubator's capacity.

---

\* Adraganth is the same as Tragacanth - gum derived from several species of the plant *Astragalus*.

\*\* Karaya - gum derived from several species of the plant *Sterculia*.

With the introduced modifications it was possible to adapt the plaque reduction neutralization test for routine use and for practical and economical titrations of FMD virus plaques readings in 24 hours.

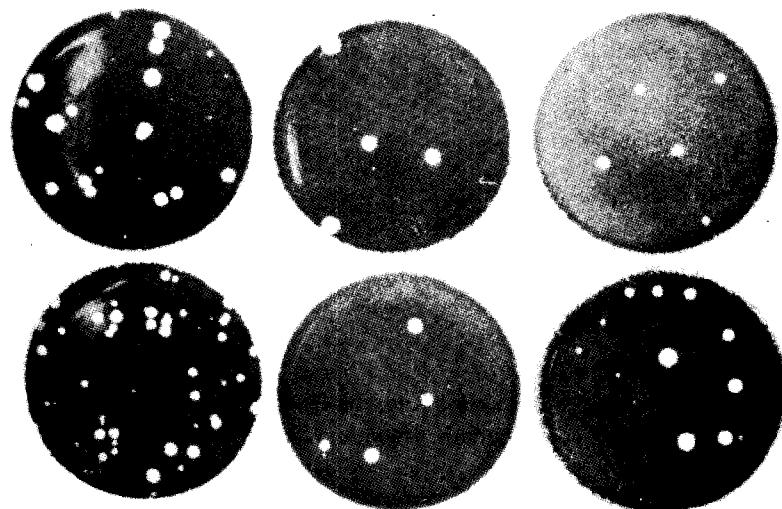


FIGURE 3. Plaques produced by foot-and-mouth disease with type O virus in IB-RS-2 cells with gum overlay after 24 hours incubation.

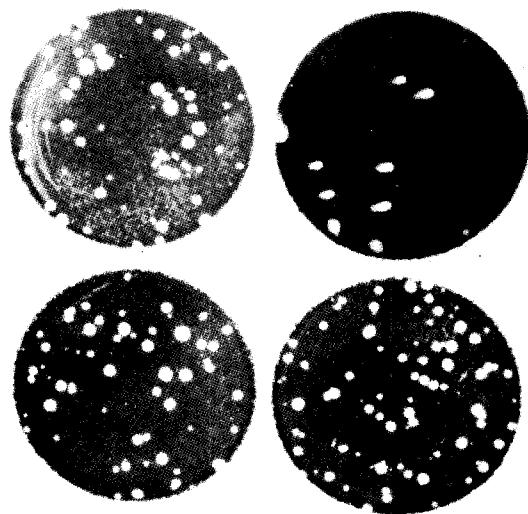


FIGURE 4. Plaques produced by foot-and-mouth disease with type O virus in IB-RS-2 cells with gum overlay after 24 hours incubation; upper right plate shows development of "comets".

## ACKNOWLEDGEMENTS

The author wishes to thank Dr. Paul Sutmoller who suggested this technique, and Mr. Pedro J. Vieira for his technical assistance.

## BIBLIOGRAPHY

1. CASTRO, Maria Pereira de.  
Clonal variation in the swine kidney cell line, IB-RS-2 in relation to morphology, karyotype and susceptibility to the foot-and-mouth disease virus (FMDV). *Arq. Inst. Biol., S. Paulo* 37 (2): 103-127, 1970.
2. MACPHERSON, I.; STOCKER, M.  
Polyoma transformation of hamster cell clones - An investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virology* 16: 147-151, 1962.
3. MANTEL, C.L.  
"The water soluble gum". Reinhold, New York, 1947.
4. McVICAR, J.W.; SUTMOLLER, P.; ANDERSEN, A.A.  
Foot-and-mouth disease virus: plaque reduction neutralization test. *Arch. ges. Virusforsch.* 44 (2): 163-172, 1974.
5. MIRCHAMSY, H.; RAPP, F.  
A new overlay for plaquing animal virus. *Proc. Soc. exp. Biol., N. York* 29 (1): 13-17, 1968.

**ENCUESTA SEROLOGICA DE FIEBRE AFTOSA EN OVINOS EN EL  
VALLE CENTRAL DE COCHABAMBA, BOLIVIA**

Ministerio de Asuntos Campesinos y Agropecuarios de Bolivia\*

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación\*\*

Organización Panamericana de la Salud\*\*\*

**RESUMEN**

Un estudio serológico realizado en el sur del valle central de Cochabamba, Bolivia, reveló un alto porcentaje de infección subclínica de fiebre aftosa en la población ovina, explotada junto con bovinos que sufrieron un ataque epidémico de la enfermedad. Mediante la prueba para detección de anticuerpos contra VIA se determinó una prevalencia de un  $44\% \pm 6\%$  de infección de fiebre aftosa en la población ovina ( $P < 0,05$ ). Alrededor del 40% de los propietarios que declararon ausencia de la enfermedad en sus ovinos tenían animales de esta especie con anticuerpos contra VIA.

(1, 9). También se llamó la atención sobre su importancia en el ciclo de transmisión aérea (11).

McVicar y Sutmöller estudiaron la difusión de la FA en grupos de ovinos, encontrando que la fiebre y las lesiones son indicadores útiles de la infección, pero demasiado variables como para ser utilizados como el único criterio (9). Los pocos informes escritos sobre brotes de FA en ovinos, bajo condiciones de campo, concuerdan en que las lesiones son, a menudo, de difícil observación (5). También fue demostrado que un gran porcentaje de ovinos infectados desarrollaron anticuerpos circulantes neutralizantes, junto con anticuerpos contra el antígeno asociado a la infección (VIA) (9).

**INTRODUCCION**

Varios investigadores indicaron que el ovino puede ser huésped importante del virus de la fiebre aftosa (FA), bajo condiciones naturales (1, 4, 6, 7, 8, 10), pero, todavía es una cuestión a responder el papel que juegan en la epidemiología de la enfermedad.

El ovino puede infectarse fácilmente en contacto estrecho con animales infectados

El valle central de Cochabamba, Bolivia, donde la enfermedad es endémica, se caracteriza por el predominio de minifundios que explotan bovinos junto con ovinos. En el transcurso de la presente década allí se aislaron de bovinos virus de los tipos O, A y C. Durante 1974 y hasta septiembre de 1975, el sur del valle citado se vio afectado por una epidemia en bovinos causada por virus subtipo A<sub>24</sub>, sin que se notificaran casos en

\* Freddy Fernández T.; Angel Quitón P. Programa de Sanidad Animal, Casilla 3224, Cochabamba, Bolivia.

\*\* Godofredo Mauricio Bulman. Programa de Sanidad Animal, Casilla 3224, Cochabamba, Bolivia.

\*\*\* Maria Elma V. Ferreira; Magnus Stael Sondahl; A. Alonso Fernández. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, Caixa Postal 589-ZC-00, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

la especie ovina, que no está sujeta a vacunación. Hasta la época del estudio la vacunación contra la FA sólo se hizo en bovinos, y en forma sistemática.

En esa circunstancia, la Dirección del Programa de Sanidad Animal del Ministerio de Asuntos Campesinos y Agropecuarios (MACA), (Proyecto 73/012 del PNUD) que ejecuta la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) en Bolivia, decidió efectuar un estudio para conocer la relación del agente del brote con el huésped ovino. Para tal efecto fue solicitada la ayuda del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (CPFA), que propuso una encuesta retrospectiva por entrevista y un muestreo serológico para determinar tasas de infección y niveles de anticuerpos neutralizantes. Aquí se presenta el resultado de esa investigación.

La encuesta se realizó en base a una muestra que se extrajo mediante un procedimiento de selección en dos etapas. En la primera se eligieron 81 propietarios, con probabilidad proporcional al tamaño de los rebaños. Equivale a una fracción de 1/17 de propietarios encuestados. En la segunda se seleccionaron al azar 3 ovinos por rebaño elegido, o sea, un total de 240 ovinos para sangría, lo que equivale a una fracción de muestreo aproximada de 1/43. Para esto se asumió una prevalencia de 20% y una precisión de 5%.

Los sueros fueron examinados en el CPFA, en Rio de Janeiro, donde se realizó, asimismo el análisis estadístico de los datos. Para la detección de anticuerpos contra el antígeno VIA se aplicó la prueba de doble difusión en agar gel (8) y para anticuerpos neutralizantes, la microtécnica (2).

#### MATERIAL Y METODOS

El área en estudio tiene, aproximadamente, 8.000 hectáreas con 1.900 propietarios y 12.000 bovinos. Además, 1.400 de los propietarios poseen 10.200 ovinos. Alrededor del 56% de las propiedades son menores de 1 hectárea y el 40%, de 1 a 5 hectáreas. Predominan los bovinos pertenecientes a la raza holandesa y los ovinos de raza merino. La comparación de superficie y población de bovinos y ovinos revela la existencia de 1,8 unidades animales por hectárea.

Se hizo una encuesta\* por entrevista para estimar la prevalencia de la FA, en el período 1974-1975, tomando como universo los 1.400 propietarios que crían en vivencia estrecha ovinos y bovinos. La entrevista se complementó con una recolección de muestras de sangre en la especie ovina. La en-

#### RESULTADOS

La tabla 1 muestra que el 47% de los 81 propietarios entrevistados declararon que sus bovinos enfermaron de FA en el año 1974 y el 54% en 1975. Para cada año, sólo el 5% declaró haber observado la enfermedad en sus ovinos. El examen serológico de 192 ovinos mostró que 84 eran VIA positivos, lo que indica que con  $P < 0,05$  la prevalencia de infección por virus de la FA en la población ovina fue de  $44\% \pm 6\%$ .

TABLA 1. Rebaños con bovinos y ovinos enfermos de fiebre aftosa según entrevista. Cochabamba, Bolivia, 1974-1975.

Año	Rebaños con	
	Bovinos afectados	Ovinos afectados
1974	39/81(47%)	4/81(5%)
1975	44/81(54%)	4/81(5%)

\* El diseño de este muestreo fue realizado por el Dr. Raúl Serrano J., MACA, Bolivia.

La tabla 2 muestra que en noviembre 1975 en 45 (56%) de los 81 rebaños encuestados hubo uno o más ovinos positivos al VIA, lo que contrasta con el 5% declarado para ese año en la encuesta. Al relacionar este resultado con la ocurrencia de FA en bovinos de los mismos establecimientos se observa que en el 58% y 67% de ellos los propietarios declararon haber tenido la enfermedad en 1974 y 1975 respectivamente.

**TABLA 2. Rebaños según VIA en ovinos en nov-1975 y ocurrencia de FA en bovinos en 1974 y 1975. Cochabamba, Bolivia.**

Año	Rebaños según VIA en ovinos en 1975	
	+	-
1974	26/45(58%)	13/36(36%)
1975	30/45(67%)	14/36(39%)

En la tabla 3 se relaciona la existencia de anticuerpos contra VIA y anticuerpos neutralizantes en los 192 sueros ovinos que pudieron ser analizados del total de 240 enviados desde Cochabamba. De los 109 sueros con anticuerpos neutralizantes, el 36% fue positivo para virus O, el 48% para virus C y un 55% para virus A. El 33% de los sueros tenía anticuerpos neutralizantes para dos o los tres tipos de virus. Este resultado coincide con la

**TABLA 3. Anticuerpos contra VIA y anticuerpos neutralizantes en sueros ovinos de Cochabamba, Bolivia, 1975.**

Anticuerpos	Anticuerpos contra VIA		Total ovinos
	+	-	
Anticuerpos neutralizantes	70	39	109
—	0	83	83
Total	70	122	192

cronología de los diagnósticos de tipos de virus. Es interesante notar que todos los ovinos con anticuerpos contra VIA también tenían anticuerpos neutralizantes fenómeno que, asimismo, sucedió con el 32% de los ovinos negativos al VIA.

La tabla 4 muestra el mismo tipo de asociación referida a rebaños ovinos, encontrándose un resultado similar. Todos los rebaños positivos a VIA tenían uno o más ovinos de la muestra con anticuerpos neutralizantes y, asimismo, el 40% de los rebaños negativos al VIA. Por otro lado, llamamos la atención al hecho de que casi el 75% de los 57 rebaños infectados fueron detectados por la prueba de los anticuerpos VIA.

**TABLA 4. Anticuerpos contra VIA y anticuerpos neutralizantes en rebaños ovinos de Cochabamba, Bolivia, 1975.**

Anticuerpos	Anticuerpos contra VIA		Total rebaños
	+	*	
Anticuerpos neutralizantes	42	15	57
—	0	23	23
Total	42	38	80

\* Por lo menos 1 animal positivo por rebaño.

#### DISCUSION Y CONCLUSIONES

La investigación realizada en Cochabamba ofrece elementos que prueban la posibilidad de ocurrir una elevada prevalencia de infeción por FA en ovinos, sin una manifestación paralela de síntomas que llamen la atención. Este fenómeno puede deberse a una combinación de factores, como: infecciones inaparentes, cuadros clínicos benignos de corta duración y poca atención de los propietarios. A este respecto, conviene recordar que, en las explotaciones ovejeras, la cojera por "foot-rot"

u otras causas se considera un accidente sin mucha importancia, mientras no sea muy difundida o impida la locomoción.

Otras veces, es cierto, las epidemias en ovinos son bien notorias, en particular cuando atacan en épocas de parición y pueden caracterizarse por una elevada mortalidad de corderos recién nacidos.

En el caso de Cochabamba es evidente que las epidemias de FA observadas en bovinos, en 1974 y 1975, incluyeron una apreciable infección inaparente de la población ovina que habita el mismo medio. En circunstancias como esa, ignoramos el papel que juega la especie ovina frente a la bovina en relación con el mantenimiento y transmisión del virus. Sin embargo, los resultados favorables del combate de la fiebre aftosa, en algunos lugares, con la vacunación casi exclusiva de la especie bovina, haría pensar que, por lo menos en ellos, el ovino es un factor secundario en la persistencia del virus.

La prueba de VIA demostró ser muy útil para detectar la infección, si bien hubo cierto porcentaje de ovinos negativos a esta prueba que tenían anticuerpos neutralizantes. Esto podría deberse a la falta de desarrollo de an-

ticuerpos contra VIA, a una mayor persistencia de los anticuerpos neutralizantes y al efecto de vacunaciones. Este último factor sería insignificante o nulo en Cochabamba, ya que la especie ovina no se acostumbra vacunar. La distribución encontrada de los anticuerpos neutralizantes, en coincidencia con el registro de identificaciones de tipos de virus, habla a favor de un proceso infeccioso. Además, los títulos de los anticuerpos neutralizantes eran muy altos, sin valores intermedios, lo que sugiere un proceso infeccioso y no el efecto de una vacunación.

La existencia de animales infectados que resultan ser VIA negativos, que también fue observado en otros estudios (3, 9), indica la necesidad de tener en cuenta este factor, ya sea para estudios de poblaciones o de individuos. En el primer caso, sobre todo cuando se trata de verificar la situación de un área donde no se registra la enfermedad por mucho tiempo y que se pretende declarar libre de FA. En el segundo, cuando se trata del comercio internacional de animales. En ambos casos, la prueba VIA es un antecedente muy valioso, que debe ir complementada con otros exámenes e informaciones.

#### REFERENCIAS

1. BURROWS, R.  
The persistence of foot-and-mouth disease virus in sheep. *J. Hyg., Camb.* 66 (4): 507, 1968.
2. FERREIRA, Maria Elma V.  
Prueba de microneutralización para estudios de anticuerpos de la fiebre aftosa. *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa 21-22:* 17-24, 1976.
3. ALONSO FERNANDEZ, A.; AUGÉ DE MELLO, P.; GOMES, I.; ROSENBERG, F.  
El uso del antígeno asociado a la infección viral (VIA) en la detección de ganado expuesto al virus de la fiebre aftosa. *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa 17-18:* 17-22, 1975.
4. GEERING, W.A.  
Foot-and-mouth disease in sheep. *Aust. Vet. J.* 43: 485-489, 1967.
5. LEANIZ RIVARA, R.; GALMARINI, C.R.; GOMEZ, Br. J.P.  
Fiebre aftosa en ovinos. *Gac. vet.* 31 (226): 223-236, 1969.
6. LITTLEJOHN, Annie I.  
Foot-and-mouth disease in sheep. *State Vet. J.* 25 (73): 3-12, 1970.

7. McVICAR, J.W.; SUTMÖLLER, P.  
Sheep and goats as foot-and-mouth disease carriers. *U.S. Livest. Sanit. Ass. Proc.* 72:400-406, 1968.
8. McVICAR, J.W.; SUTMÖLLER, P.  
Foot-and-mouth disease: the agar gel diffusion precipitin test for antibody to virus-infection-associated (VIA) antigen as a tool for epizootiologic surveys. *Am. J. Epidemiol.* 92 (4): 273-278, 1970.
9. McVICAR, J.W.; SUTMÖLLER, P.  
Experimental foot-and-mouth disease in sheep and goats: an epizootiological model. *Arch. ges. Virusforsch.* 38 (1): 85-96, 1972.
10. RIVENSON, S.; SEGURA, Martina; ZAKIN, M.M.  
Anticuerpos en bovinos infectados experimentalmente y vacunados contra la fiebre aftosa. *Patología Animal Serie 4*, nº 14.  
Trabajo realizado en el Instituto de Fiebre Aftosa del INTA y presentado en las Terceras Jornadas de la Facultad de Ciencias Veterinarias de La Plata, efectuadas en noviembre de 1964. *Revta Invest. Agrop. ser. 4 1* (14): 171-179, 1964.
11. SELLER, R.F.; PARKER, J.  
Airborne excretion of foot-and-mouth disease virus. *J. Hyg., Camb.* 67 (4): 671, 1969.

## SEROLOGICAL SURVEY OF FOOT-AND-MOUTH DISEASE IN SHEEP IN THE CENTRAL VALLEY OF COCHABAMBA, BOLIVIA

Ministry of Agricultural and Peasant Affairs of Bolivia\*

Food and Agriculture Organization of the United Nations\*\*

Pan American Health Organization\*\*\*

### SUMMARY

A serological survey in the south of the central valley of Cochabamba, Bolivia, showed a high percentage of subclinical infection of foot-and-mouth disease in a sheep population kept in close contact with cattle that had suffered from a severe epidemic of the disease. VIA tests showed that a prevalence rate of  $44 \pm 6\%$  of foot-and-mouth disease existed in the cattle population ( $P < 0.05$ ). About 40% of the owners who stated that their sheep had not had the disease were shown to have sheep with VIA antibodies.

### INTRODUCTION

Several investigators have indicated that sheep can be an important host for foot-and-mouth disease (FMD) virus under natural conditions (1, 4, 6, 7, 8, 10) but the exact role that sheep play in the epidemiology of the disease is still an open question.

Sheep can be easily infected by close contact with infected animals (1, 9); aerosol transmission may also play an important role (11).

McVicar and Sutmöller, studying the spread of FMD in groups of sheep, found that fever and lesions are useful indicators of infection, although they are too variable to be used as the only criterion (9). The few reports on outbreaks of FMD in sheep under field conditions agreed that the lesions are often small and difficult to observe (5). They also showed that a high percentage of infected sheep developed circulating neutralizing antibodies as well as virus-infection-associated-antigen (VIA) antibodies (9).

In the central valley of Cochabamba, Bolivia, the disease is endemic, and cattle and sheep are kept together mainly on small farms. Types O, A and C virus have been isolated in the 1970's. From 1974 to September 1975, an epidemic of subtype A<sub>24</sub> among cattle in the southern part of the valley, although no FMD was reported in sheep. The sheep population is not vaccinated, although until the time of the study cattle were systematically vaccinated against FMD.

Under these circumstances, the Directorate of the Animal Health Program of the Ministry of Agricultural and Peasant Affairs (MACA) (Project 73/012 of the United Nations Development Program-UNDP) which was carried out

\* Freddy Fernández T.; Angel Quitón P. Programa de Sanidad Animal, Casilla 3224, Cochabamba, Bolivia.

\*\* Godofredo Mauricio Bulman. Programa de Sanidad Animal, Casilla 3224, Cochabamba, Bolivia.

\*\*\* Maria Elma V. Ferreira; Magnus Stael Söndahl; A. Alonso Fernández. Pan American Foot-and-Mouth Disease Center, Caixa Postal 589-ZC-00, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

by the Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO) in Bolivia, decided to study the relationship of the outbreak and the sheep as potential hosts. This retrospective survey, carried out with the assistance of the Pan American Foot-and-Mouth Disease Center (PAFMDC), used interviewing and serological samples to determine infection rates of neutralizing antibodies. This report presents the results of that survey.

#### MATERIALS AND METHODS

The central Cochabamba valley has approximately 8,000 hectares with 1,900 livestock owners and 12,000 cattle. Moreover, 1,400 of the owners also keep a total of 10,200 sheep. Approximately 56% of the owners have farms of less than 1 hectare and 40% have 1 to 5 hectares. The predominant breed of cattle is Frisian-Holstein and that of sheep is merino. A comparison of the area and the cattle and sheep population showed the existence of 1.8 animals per hectare.

An interview survey\* was carried out to estimate the prevalence of FMD during 1974-1975, taking as its universe the 1,400 owners who raise cattle and sheep in close contact. Survey samples of sheep were collected. The survey was made on the basis of samples taken by means of a 2-step selection procedure. In the first step 81 owners were selected with probability proportional to the size of the herd. The 81 owners equally 1/17 of the surveyed farmers. In the second step, a random selection of 3 sheep per herd was made, giving a total of 240 sheep for bleeding, a sample fraction of approximately 1/43. A prevalence of 20% and precision of 5% were assumed.

The sera were examined at the PAFMDC where the statistical analysis was also performed. The agar gel double diffusion test was

used for the detection of VIA antibodies (8) and circulating neutralizing antibodies were tested by microtechniques (2).

#### RESULTS

Table 1 shows that 47% of the 81 surveyed declared that their cattle had FMD in 1974 and 54% in 1975. For each year, only 5% had observed the disease in their sheep. Serological testing of 192 sheep showed that 84 were VIA-positive, indicating that with  $P < 0.05$  the prevalence of FMD virus infection in the sheep population was  $44\% \pm 6\%$ .

TABLE 1. Herds of cattle and sheep with FMD according to interviews. Cochabamba, Bolivia, 1974-1975.

Year	Herds with	
	Affected cattle	Affected sheep
1974	39/81(47%)	4/81(5%)
1975	44/81(54%)	4/81(5%)

Table 2 shows that in November 1975, 45 (56%) of the 81 surveyed herds had one or more VIA-positive sheep in contrast to the 5% observed by farmers in the same year. Relating this result to the occurrence of FMD in cattle on the same farms it can be seen that 58% and

TABLE 2. Herds according to VIA in sheep in November 1975 and occurrence of FMD in cattle in 1974 and 1975. Cochabamba, Bolivia.

Year	Herds according to VIA in sheep in 1975	
	+	-
1974	26/45(58%)	13/36(36%)
1975	30/45(67%)	14/36(39%)

\*The sample design was developed by Dr.Raúl Serrano J., MACA, Bolivia.

67% of the owners declared to have had disease in 1974 and 1975, respectively.

Table 3 shows the relationship of VIA antibodies and circulating antibodies in the 192 sheep sera that could be analyzed of the 240 sent from Cochabamba. Of 109 sera with neutralizing antibodies, 36% were positive for virus O, 48% for virus C and 55% for virus A. Of the 192, 33% had neutralizing antibodies for two or all three types of virus. These results coincide with the chronology of diagnosis of the types of virus. It is interesting to note that all sheep with VIA antibodies also had neutralizing antibodies, as did 32% of the VIA-negative sheep.

TABLE 3. *VIA antibodies and neutralizing antibodies in sheep serum from Cochabamba, Bolivia. 1974.*

	VIA antibodies		Total sheep
	+	-	
Neutralizing +	70	39	109
antibodies -	0	83	83
Total	70	122	192

Table 4 shows a similar association within sheep herds. All VIA-positive flocks had one or more sheep with circulating antibodies.

TABLE 4. *VIA antibodies and neutralizing antibodies in sheep herds from Cochabamba, Bolivia. 1975.*

	VIA antibodies		Total herds
	+	-	
Neutralizing* +	42	15	57
antibodies -	0	23	23
Total	42	38	80

\* At least 1 positive animal in the herd.

as did the 40% of VIA-negative herds. We would like to note that nearly 75% of the 57 infected flocks were detected by the VIA test.

#### DISCUSSION AND CONCLUSIONS

The research carried out in Cochabamba shows that a high prevalence of FMD in sheep can take place without any visible signs occurring. This phenomenon could be due to a combination of the factors, including inapparent infections, clinical signs of short duration and lack of attention by the owners. It is important to note that foot-rot or other causes of lameness are not considered important as long as the signs are not widespread or do not inhibit the animal's movements.

However, sometimes, epidemics in sheep are noticeable, especially when the disease attacks during the lambing season causing a high mortality among newborn lambs.

It is clear that the FMD epidemics in cattle during 1974 and 1975 in Cochabamba produced an appreciable inapparent infection within sheep populations on the same premises. Under these circumstances, the role played by sheep in the maintenance and transmission of virus among cattle is still not clear. However, favorable results against FMD have been obtained in some places with vaccination limited almost exclusively to cattle. This indicates that sheep are a secondary factor in the persistence of the virus.

The VIA test proved to be most useful in the detection of infection, although some of the VIA-negative sheep also had neutralizing antibodies. This could be caused by the lack of development of VIA antibodies, by a greater persistence of neutralizing antibodies, and by the effect of vaccinations. This last factor is unimportant in Cochabamba since the sheep are usually not vaccinated. The distribution of neutralizing antibodies along with the record

of virus typing would seem to favor an infectious process. Also, the titers of the neutralizing antibodies were very high, with no intermediate values, which suggests an infectious process and not the effect of vaccination.

The existence of infected animals which are VIA-negative, also observed in other studies (3, 9), indicates the need to consider

this factor when carrying out future studies of populations or individuals. With population studies this is especially true in verification of a situation in areas where FMD has not been reported for a long time and hope to be declared free of the disease, which and with individual cases in terms of trade. In both cases, the results of the VIA test are valuable but must be complemented by other tests and information.

#### REFERENCES

1. BURROWS, R.  
The persistence of foot-and-mouth disease virus in sheep. *J. Hyg., Camb.* 66 (4): 507, 1968.
2. FERREIRA, Maria Elma V.  
Prueba de microneutralización para estudios de anticuerpos de la fiebre aftosa. *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa 21-22:* 17-24, 1976.
3. ALONSO FERNANDEZ, A.; AUGE DE MELLO, P.; GOMES, I.; ROSENBERG, F.  
El uso del antígeno asociado a la infección viral (VIA) en la detección de ganado expuesto al virus de la fiebre aftosa. *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa 17-18:* 17-22, 1975.
4. GEERING, W.A.  
Foot-and-mouth disease in sheep. *Aust. Vet. J.* 43: 485-489, 1967.
5. LEANIZ RIVARA, R.; GALMARINI, C.R.; GOMEZ, Br. J.P.  
Fiebre aftosa en ovinos. *Gac. vet.* 31 (226): 223-236, 1969.
6. LITTLEJOHN, Annie I.  
Foot-and-mouth disease in sheep. *State Vet. J.* 25 (73): 3-12, 1970.
7. McVICAR, J.W.; SUTMÖLLER, P.  
Sheep and goats as foot-and-mouth disease carriers. *U.S. Livest. Sanit. Ass. Proc.* 72: 400-406, 1968.
8. McVICAR, J.W.; SUTMÖLLER, P.  
Foot-and-mouth disease: the agar gel diffusion precipitin test for antibody to virus-infection-associated (VIA) antigen as a tool for epizootiologic surveys. *Am. J. Epidemiol.* 92 (4): 273-278, 1970.
9. McVICAR, J.W.; SUTMÖLLER, P.  
Experimental foot-and-mouth disease in sheep and goats: an epizootiological model. *Arch. ges. Virusforsch.* 38 (1): 85-96, 1972.
10. RIVENSON, S.; SEGURA, Martina; ZAKIN, M.M.  
Anticuerpos en bovinos infectados experimentalmente y vacunados contra la fiebre aftosa. *Patología Animal Serie 4, nº 14.*  
Trabajo realizado en el Instituto de Fiebre Aftosa del INTA y presentado en las Terceras Jornadas de la Facultad de Ciencias Veterinarias de La Plata, efectuadas en noviembre de 1964. *Revta Invest. Agrop. ser. 4 1* (14): 171-179, 1964.
11. SELLER, R.F.; PARKER, J.  
Airborne excretion of foot-and-mouth disease virus. *J. Hyg., Camb.* 67 (4): 671, 1969.

VACUNAS CONTRA LA FIEBRE AFTOSA CON VIRUS PRODUCIDO EN CULTIVOS CELULARES CON SUERO BOVINO TRATADO POR POLIETILENGLICOL (PEG)\*

Daniel Abaracón\*\*, Homero Giacometti\*\*

COMUNICACION PREVIA

Barteling (4) describió el uso de PEG en suero de bovinos vacunados contra la fiebre aftosa (FA), para precipitar los anticuerpos y otros elementos inhibidores de la replicación del virus. Este autor utilizó suero en varias concentraciones en el medio de cultivo para crecimiento de células BHK-21 en suspensión y encontró que su efecto como elemento promotor de crecimiento celular es casi igual al efecto del mismo suero sin tratar con PEG. También informó que fue posible inocular con virus células que desarrollaron en medio de cultivo con suero tratado con PEG, sin cambio de medio, lo que simplifica el proceso de producción de antígeno (4).

En nuestros ensayos preliminares con el uso de sueros tratados con PEG en cultivos celulares, hemos estudiado tres aspectos:

a) Eliminación de los anticuerpos en sueros de bovinos faenados en mataderos de regiones donde la FA es endémica.

b) Crecimiento celular utilizando suero de una misma partida de la cual una fracción fue tratada con 8,0% de PEG y otra fracción no fue tratada.

c) Producción y ensayos de eficacia de vacunas inactivadas preparadas con virus replicados en células BHK-21 Clon 13 en suspensión, en medio sin suero y suero tratado con PEG.

La tabla 1 muestra los títulos neutralizantes (7) antes y después del tratamiento con PEG. Los resultados son similares a los obtenidos con otras partidas de sueros.

En cultivos celulares en suspensión no hemos encontrado diferencias en el crecimiento celular usando ambas fracciones.

Ya hemos incorporado a nuestra rutina de trabajo el uso de sueros tratados con PEG para todos los cultivos celulares destinados a titulaciones de virus y a pruebas de ausencia de infectividad de virus en vacunas inactivadas. La susceptibilidad de estos cultivos al virus de la FA es superior a la de los cultivos celulares producidos con los mismos sueros sin tratar por PEG.

Se prepararon 2 vacunas trivalentes conforme a la técnica clásica con suero normal, enfriamiento, sedimentación, resuspensión de células e infección con virus (vacuna A) y con virus replicados en cultivos celulares sin enfriar, en su propio medio de crecimiento contenido 5,0% de suero bovino tratado por PEG (vacuna B).

En ambas técnicas se usaron las mismas semillas de virus a la misma multiplicidad de infección y los virus producidos fueron sometidos al mismo tratamiento con cloroformo al 1,0% bajo fuerte agitación, clarificación

---

\* Polyethylene Glycol 6000. J.T. Baker, New Jersey 08865.

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

por placa Seitz K2, e inactivación por etile-nimina binaria (BEI) (1 y 2).

Las vacunas se prepararon en la siguiente forma: las suspensiones víricas monovalentes, cuyos títulos infectante 50%/ml y fijador del complemento figuran en la Tabla 2, después de inactivadas y sometidas a pruebas de no infectividad, se mezclaron en forma trivalente y se les agregó hidróxido de aluminio (al 2,5% Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). Despues de dejar en agitación por algunas horas, se dejó sedimentar el hidróxido de aluminio y se eliminó el líquido sobrenadante en cantidad suficiente para que cada dosis de vacuna trivalente de 5,0 ml contuviera el equivalente a: a) 2 ml de suspensión vírica de cada tipo; b) 2 ml de Al(OH)<sub>3</sub>; c) 5 mg de saponina P<sub>3</sub>\*; d) 0,25 ml de glicerina neutra y e) merthiolate Lilly a una concentración final de 1:30.000.

La protección conferida por ambas vacunas se evaluó por índice de seroprotección (ISP) (6) en 20 bovinos de 15 meses de edad, de

raza Hereford, no vacunados y libres de anticuerpos contra la FA antes de la vacunación. Estos animales fueron criados y mantenidos durante la prueba en un establecimiento donde no se ha comprobado casos de FA por más de 12 años. Los bovinos identificados con los números 1 al 9 se vacunaron con vacuna A producida por el método clásico (Tabla 3) y los numerados 10 al 20 con vacuna B producida con suero tratado con PEG (Tabla 4).

No se observó diferencia significativa en ambos grupos tanto en porcentaje de animales considerados protegidos (ISP > 2,0) sobre el total, como en las expectativas porcentuales de protección según Gomes y Astudillo (8).

La conclusión preliminar es que el tratamiento de suero con PEG se muestra muy promisorio para la producción industrial de vacunas con virus replicados en cultivos celulares en suspensión. Los cultivos celulares pueden ser inoculados con el virus en el momento óptimo del crecimiento celular, sin pasar por las etapas de enfriamiento, sedimentación y substitución del medio de crecimiento celular por medio sin suero. La eliminación de estas etapas del proceso ofrecería grandes ventajas industriales, por aumento de capacidad de la planta instalada ya

\* Food Industries Ltd. Walton on Thames, Surrey, England.

TABLA 1 - Títulos neutralizantes contra el virus de la fiebre aftosa de suero antes y después del tratamiento con PEG

	Tipo de Virus		
	O <sub>1</sub>	A <sub>24</sub>	C <sub>3</sub>
Antes de tratado <sup>a)</sup>	3,1*	3,1	3,0
Después de tratado <sup>b)</sup>	0,8	0,5	0,8

\* Microneutralización en células IBRS-2 (7).

a) Suero centrifugado y filtrado por placas Seitz EKS.

b) El mismo suero tratado con 8,0% de PEG por 1 hora a 4° C, centrifugado y filtrado por placas EKS.

**TABLA 2 - Características de los antígenos producidos en células BHK-21 en suspensión con el método convencional y con suero tratado por PEG**

Tipo de Virus	Títulos del antígeno	
	CCDI <sub>50</sub> %/ml*	FC**
<b>Vacuna A<sup>a)</sup></b>		
O <sub>1</sub>	10 <sup>7,2</sup>	1/10
A <sub>24</sub>	10 <sup>7,2</sup>	1/11
C <sub>3</sub>	10 <sup>7,3</sup>	1/12
<b>Vacuna B<sup>b)</sup></b>		
O <sub>1</sub>	10 <sup>7,5</sup>	1/13
A <sub>24</sub>	10 <sup>7,4</sup>	1/14
C <sub>3</sub>	10 <sup>7,3</sup>	1/12

\* 50% dosis infectante por cultivo celular.

\*\* 3 unidades de complemento y 90 minutos contacto suero y virus.

a) Procedimiento convencional con suero normal.

b) Procedimiento ensayado con suero tratado por PEG.

que los tanques serían ocupados por un menor tiempo para cada ciclo de producción de virus, por economía de medio de cultivo, y por ahorro de células que siempre se pierden o afectan parcialmente en su vitalidad en los procesos de enfriamiento y resuspensión.

En la preparación de vacunas con antígenos producidos con células en suspensión por el método convencional siempre quedan cantidades residuales de suero. Esas pequeñas cantidades de suero desnaturalizadas por la acción de formalina durante el proceso

de inactivación de las vacunas, han sido factores desencadenantes de severas reacciones alérgicas de tipo inmediato en bovinos sensibilizados (5). Por esa razón consideramos que se debería usar inactivantes como el BEI que no tendría acción sobre el suero (3). Es de fundamental importancia determinar si una vacuna cuya suspensión antigenica contiene 5,0% de suero bovino, podría actuar como sensibilizante para futuras vacunaciones.

TABLA 3 - *Indices de seroprotección de los bovinos 28 días postvacunación con vacuna producida por el método convencional*

Bovino Nº	Tipo de Virus		
	O <sub>1</sub>	A <sub>24</sub>	C <sub>3</sub>
1	3,3	5,3	3,8
2	3,5	4,5	4,3
3	4,5	5,4	≥ 4,0
4	3,0	1,8	2,5
5	2,3	2,8	2,1
6	2,3	4,2	2,0
7	≥ 5,5	≥ 5,8	4,9
8	≥ 5,3	≥ 5,8	5,0
9	4,8	2,7	4,9
Valores ≥2,0 sobre el total	9/9	8/9	9/9
Expectativas de protección	95%	93%	95%

TABLA 4 - *Indices de seroprotección de los bovinos 28 días postvacunación con vacuna producida por el método de suero tratado por PEG*

Bovino Nº	Tipo de Virus		
	O <sub>1</sub>	A <sub>24</sub>	C <sub>3</sub>
10	2,3	3,5	1,3
11	≥ 5,3	4,8	4,4
12	4,5	2,8	2,3
13	2,8	5,0	≥ 4,0
14	5,3	4,3	≥ 4,5
15	2,3	4,3	2,0
16	2,1	5,5	1,8
17	≥ 5,5	≥ 5,8	≥ 4,5
18	5,0	≥ 5,3	5,0
19	≥ 5,3	5,5	≥ 4,6
20	≥ 5,3	3,8	≥ 4,6
Valores ≥2,0 sobre el total	11/11	11/11	9/11
Expectativas de protección	95%	95%	90%

## REFERENCIAS

1. BAHNEMANN, H.G.  
Binary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production. *Arch. Virol.* 47 (1): 47-56, 1975.
2. BAHNEMANN, H.G.; AUGE DE MELLO, P.; ABARACON, D.; GOMES, I.  
Immunogenicity in cattle of foot-and-mouth disease vaccines inactivated with binary ethyleneimine. *Bull. Off. int. Epizoot.* 81 (11-12): 1335-1343, 1974.
3. BAHNEMANN, H.G.  
Inactivation of viruses in serum with binary ethyleneimine. *J. clin. Microbiol.* 3 (2): 209-210, 1976.
4. BARTELING, S.J.  
Use of polyethyleneglycol-treated serum for production of foot-and-mouth disease virus (FMDV) in growing BHK-suspended cell cultures. *Bull. Off. int. Epizoot.* 81 (11-12): 1243-1254, 1974.
5. CAPSTICK, P.B.; PAY, T.W.F.; BEADLE, G.G.; BANDAU, R.; BOGE, A.  
Some studies on allergic reactions to foot-and-mouth disease vaccine in Lower, Saxony, Germany. European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease. Report of the Meeting of the Research Group of the Standing Technical Committee at the Instituto Zootecnico Sperimentale. Brescia, Italy, 24-26 September 1969. FAO. ROME, 1970, pp. 213-218.
6. CUNHA, R.G.; BAPTISTA JUNIOR, 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 (110): 243-267, 1957.
7. FERREIRA, M.E.V.  
Prueba de microneutralización para estudios de anticuerpos de la fiebre aftosa. *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 21-22: 17-24, 1976.
8. GOMES, I.; ASTUDILLO, V.  
Foot-and-mouth disease: evaluation of mouse protection test results in relation to cattle immunity. *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 17-18: 9-16, 1975.

VACCINES AGAINST FOOT-AND-MOUTH DISEASE IN VIRUS PRODUCED IN  
CELL CULTURES WITH BOVINE SERUM TREATED WITH  
POLYETHYLENEGLYCOL (PEG)\*

Daniel Abaracón\*\*, Homero Giacometti\*\*

PRELIMINARY REPORT

Barteling (4) described the use of serum from cattle vaccinated against foot-and-mouth disease (FMD), from which antibodies and other factors which inhibit the replication of virus had been removed by precipitation with PEG. The author used serum in varying concentrations in culture medium to grow BHK-21 cells in suspension and found that its effect on promoting cell growth was nearly equal to similar serum without PEG treatment. He also reported that it was possible to inoculate virus in cell grown in culture medium containing PEG-treated serum, without replacement of the growth medium. This latter method simplifies the process of antigen production (4).

Our preliminary experiments have focused on three aspects of the use of PEG-treated serum in cell cultures:

a) Elimination of antibodies in sera obtained from slaughterhouses located in areas where FMD is endemic;

b) Cell growth using serum divided into one portion treated with 8.0% PEG and the other portion without treatment; and

c) Production and assays of efficiency of inactivated vaccines prepared with virus replicated in BHK-21 C 13 cells in suspension, with media with PEG-treated serum and without serum.

Table 1 shows the neutralization titers (7) of the sera before and after treatment with PEG. Similar results were obtained with other batches of serum.

No growth differences were found between cell culture suspensions using either PEG-treated or non-treated serum.

The use of PEG-treated sera has already been incorporated into our routine work with cell cultures used for virus titration and for tests to determine the absence of virus infectivity in inactivated vaccines. The susceptibility of the PEG-treated cultures to FMD virus is greater than that of cultures made with the same sera without treatment.

Two trivalent vaccines were prepared, one (Vaccine A) according to the standard technique using cells grown in normal serum, cooling, sedimentation, resuspension of cells in new medium without serum and infection with virus; and the other (Vaccine B) prepared from virus replicated in cell cultures without cooling and without replacement of the growth medium which contained 5.0% bovine serum treated with PEG.

The same seed virus in the same multiplicity of infection was used for both vaccines; the virus produced were submitted to the same treatment with 1.0% chloroform under

\* Polyethylene Glycol 6000, J.T. Baker, New Jersey 08865.

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

strong agitation, clarification by Seitz K2 filters and inactivation with binary ethylenimine (BEI) (1, 2).

Both vaccines were prepared as follows: the monovalent virus suspensions (Table 2) were inactivated, tested for non-infectivity and mixed. Aluminum hydroxide gel (2.5% Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) was then added and the mixture agitated for a few hours. After sedimentation of the aluminum hydroxide, sufficient supernatant liquid was eliminated so that each 5 ml dose of trivalent vaccine contained: a) the equivalent of 2 ml of viral suspension of each type; b) 2 ml of Al(OH)<sub>3</sub>; c) 5 mg of saponin P<sub>3</sub>\*; d) 0.25 ml of neutral glycerine and e) Lilly merthiolate in a final concentration of 1:30,000.

The efficacy of both vaccines was evaluated by the mouse protection test (MPT) (6) in twenty 15-month old Hereford cattle, which

had not been vaccinated and were free of antibodies against FMD before vaccination. These animals were raised and kept on a farm where FMD had not occurred for 12 years. Cattle identified with numbers 1 to 9 were vaccinated with Vaccine A, produced according to the standard method (Table 3); and cattle numbers 10 through 20 with Vaccine B, containing PEG-treated serum (Table 4).

No significant differences were observed between the groups in terms of the percentage of animals considered protected (MPT  $\geq 2.0$ ), nor in terms of the expected percentage of protection (8).

Treatment of serum with PEG thus appears to be very promising for the industrial production of vaccines with virus replicated in cell cultures in suspension. The cell cultures can be inoculated with the virus at the optimum point of cell growth without going through the stages of cooling, sedimentation and replacement of the cell growth medium by medium without serum. The elimination of these

\* Food Industries, Ltd., Walton-on-Thames, Surrey, England.

TABLE 1 - *Neutralization titers against foot-and-mouth disease virus of serum before and after treatment with PEG*

	Type of virus		
	O <sub>1</sub>	A <sub>24</sub>	C <sub>3</sub>
Before treatment <sup>a)</sup>	3.1*	3.1	3.0
After treatment <sup>b)</sup>	0.8	0.5	0.8

\* Microneutralization in IBRS-2 cells (7).

a) Serum centrifuged and filtrated by Seitz EKS filters.

b) The same serum treated with 0.8% PEG for 1 hour at 4° C, centrifugated and filtrated through Seitz EKS filters.

TABLE 2 - *Characteristics of antigens produced in BHK-21 cells in suspension by conventional methods and with PEG-treated serum*

Type of virus	Antigen titer	
	CCID <sub>50</sub> /ml*	CF **
<b>Vaccine A<sup>a)</sup></b>		
O <sub>1</sub>	10 <sup>7.2</sup>	1/10
A <sub>24</sub>	10 <sup>7.2</sup>	1/11
C <sub>3</sub>	10 <sup>7.3</sup>	1/12
<b>Vaccine B<sup>b)</sup></b>		
O <sub>1</sub>	10 <sup>7.5</sup>	1/13
A <sub>24</sub>	10 <sup>7.4</sup>	1/14
C <sub>3</sub>	10 <sup>7.3</sup>	1/12

\* Cell culture infectant dose 50% per ml.

\*\* Complement fixation titer using 3 units of complement and 90 minutes serum and virus contact.

a) Conventional procedure with normal serum.

b) Assayed procedure with PEG-treated serum.

stages presents several advantages for industrial production, due to increased production capacity, since less time is required for each cycle of virus production; use of less culture medium; and the savings in cells which normally are lost or damaged through the process of cooling and resuspension.

Small quantities of serum always remain in vaccines produced from cell suspension cultures prepared by conventional methods. These small quantities of serum, denatured

by the action of formalin during vaccine inactivation, may trigger severe allergic reactions in sensitized cattle (5). Therefore, we believe that inactivants such as BEI must be used which do not act on the serum (3). It is of fundamental importance to determine whether a vaccine containing antigen suspensions with 5.0% bovine serum could act as a sensitizing agent in future vaccinations.

TABLE 3 - *Mouse protection index of cattle 28 days post-vaccination with conventionally produced vaccine*

Cattle No.	Type of virus		
	O <sub>1</sub>	A <sub>24</sub>	C <sub>3</sub>
1	3.3	5.3	3.8
2	3.5	4.5	4.3
3	4.5	5.4	> 4.0
4	3.0	1.8	2.5
5	2.3	2.8	2.1
6	2.3	4.2	2.0
7	> 5.5	> 5.8	4.9
8	> 5.3	> 5.8	5.0
9	4.8	2.7	4.9
Values >2.0 over total	9/9	8/9	9/9
Expected percentage of protection	95%	93%	95%

TABLE 4 - *Mouse protection index of cattle 28 days post-vaccination with vaccine produced by the PEG-treated serum method*

Cattle No.	Type of virus		
	O <sub>1</sub>	A <sub>24</sub>	C <sub>3</sub>
10	2.3	3.5	1.3
11	> 5.3	4.8	4.4
12	4.5	2.8	2.3
13	2.8	5.0	> 4.0
14	5.3	4.3	> 4.5
15	2.3	4.3	2.0
16	2.1	5.5	1.8
17	> 5.5	> 5.8	> 4.5
18	5.0	> 5.3	5.0
19	> 5.3	5.5	> 4.6
20	> 5.3	3.8	> 4.6
Values >2.0 over total	11/11	11/11	9/11
Expected percentage of protection	95%	95%	90%

## REFERENCES

1. BAHNEMANN, H.G.  
Binary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production. *Arch. Virol.* 47 (1): 47-56, 1975.
2. BAHNEMANN, H.G.; AUGÉ DE MELLO, P.; ABARACON, D.; GOMES, I.  
Immunogenicity in cattle of foot-and-mouth disease vaccines inactivated with binary ethylenimine. *Bull. Off. int. Épisoot.* 81 (11-12): 1335-1343, 1974.
3. BAHNEMANN, H.G.  
Inactivation of viruses in serum with binary ethyleneimine. *J. clin. Microbiol.* 3 (2): 209-210, 1976.
4. BARTELING, S.J.  
Use of polyethyleneglycol-treated serum for production of foot-and-mouth disease virus (FMDV) in growing BHK-suspended cell cultures. *Bull. Off. int. Épisoot.* 81 (11-12): 1243-1254, 1974.
5. CAPSTICK, P.B.; PAY, T.W.F.; BEADLE, G.G.; BANDAU, R.; BOGE, A.  
Some studies on allergic reactions to foot-and-mouth disease vaccine in Lower, Saxony, Germany. European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease. Report of the Meeting of the Research Group of the Standing Technical Committee at the Instituto Zootecnico Sperimentale. Brescia, Italy, 24-26 September 1969. FAO. ROME, 1970, pp. 213-218.
6. CUNHA, R.G.; BAPTISTA JUNIOR, 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 (110): 243-267, 1957.
7. FERREIRA, M.E.V.  
Prueba de microneutralización para estudios de anticuerpos de la fiebre aftosa. *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa 21-22:* 17-24, 1976.
8. GOMES, I.; ASTUDILLO, V.  
Foot-and-mouth disease: evaluation of mouse protection test results in relation to cattle immunity. *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa 17-18:* 9-16 , 1975.

## r e s ú m e n e s

## a b s t r a c t s

BLACK, L., PAY, T.W.F.

Texto en inglés. *J. Hyg. (Camb.)* 74 (12): 169-181, 1975. - Wellcome Foot-and-Mouth-Disease Vaccine Laboratory, Pirbright, Woking, Surrey, England -

*La evaluación de las pruebas de hipersensibilidad en el bovino tras la vacunación antiaftosa*

Este artículo describe los resultados de pruebas de hipersensibilidad dérmica (HD), anafilaxia cutánea pasiva (ACP) y provocación intravenosa (PIV), en bovinos vacunados 0, 1, 2 y 3 veces, con el fin de evaluar la relación entre ellas y la incidencia de la alergia clínica. Fueron empleados como materiales experimentales, componentes de vacuna contra fiebre aftosa y otras sustancias. Anticuerpos reaginicos, demostrados por ACP en cabras, fueron enfrentados a extractos de células BHK-21, hidroxipropilmethylcelulosa y un componente vacunal no identificado, y distribuidos en 0, 5, 19 y 75% de bovinos vacunados 0, 1, 2 y 3 veces respectivamente. Ninguno de los animales manifestó síntomas clínicos de alergia después de la vacunación. Cuando se injectó intradérmicamente extracto de células BHK-21 se notó una correlación significativa entre el desarrollo de grandes ronchas y la presencia de reaginas, aunque el tamaño de las ronchas no estaba correlacionado con el título de las reaginas. Una correlación similar se evidenció en el caso de la hidroxipropilmethylcelulosa.

La mayoría de los bovinos con grandes ronchas dérmicas poseía reaginas, pero el número de reacciones fue demasiado pequeño para una evaluación estadística. Ocurrieron reacciones dérmicas en bovinos tanto vacunados como sin vacunar a la penicilina sódica, a la carboximetilcelulosa sódica, a la saponina y a la vacuna completa; pero el lisado de células BHK-21 y el suero normal bovino provocaron ronchas que aumentaron en frecuencia en el mismo

*The evaluation of hypersensitivity tests in cattle after foot-and-mouth disease vaccination*

This paper describes the results of performing dermal hypersensitivity (DH) passive cutaneous anaphylaxis (PCA) and intravenous provocation (IVP) tests in cattle vaccinated 0, 1, 2 and 3 times, with the aim of evaluating the relation of the tests one to another and to the incidence of clinical allergy. Components of foot-and-mouth disease vaccine and other substances were used as test materials. Reaginic antibodies, demonstrated by PCA tests in goats were directed against BHK-21 cell extracts, hydroxypropylmethylcellulose, and an unidentified vaccine component and distributed in 0, 5, 19 and 75% of cattle vaccinated 0, 1, 2 and 3 times respectively. None of the animals showed clinical signs of allergy after vaccination. When BHK-21 cell extract was injected intradermally a significant correlation was noted between the development of large weals and the presence of reagins, although the size of the weals was not correlated with the reagin titers. A similar trend was evident in the case of hydroxypropylmethylcellulose.

The majority of cattle with large dermal weals possessed reactions but the number of reactions was too small for statistical evaluation. Dermal reactions to sodium penicillin, sodium carboxymethylcellulose. saponin and whole vaccine occurred in both vaccinated and unvaccinated cattle but BHK-21 cell lysate and normal bovine serum provoked weals which increased in frequency according to the number of vaccinations experienced. Intravenous hydroxypropylmethylcellulose elicited a response in all

sentido del número de vacunaciones practicadas. La hidroxipropilmethylcelulosa inoculada por vía intravenosa produjo respuesta en todos los animales inyectados previamente con ciertas partidas de vacuna; no produjo respuesta en ninguno de los animales previamente inyectados con otras partidas de vacuna; tampoco produjo respuesta en ninguno de los animales control, sin vacunar. Extracto de células BHK-21 inyectado por vía intravenosa provocó respuesta clínica en la mitad de los animales, pero esa respuesta no estaba correlacionada con los resultados de las pruebas de ACP o HD.

the animals previously injected with certain batches of vaccine but none in those inoculated with other batches or in unvaccinated controls. BHK-21 cell extract injected intravenously produced a clinical response in half the tested animals which was uncorrelated with the results of PCA or DH tests.

COWAN, K.M., EROL, N., WHITELAND, A.P.

Texto en inglés. 14th Conf. O.I.E. Comm., Paris, 1975.

*Heterogeneidad del virus aftoso tipo Asia 1 y de las células BHK-21 y la relación a la preparación de vacuna*

Las características formadoras de placas del virus aftoso tipo Asia 1 producido para la elaboración de vacuna, se encontraron ser diferentes, dependiendo de la línea de células BHK-21 empleada para el cultivo viral, el método de cultivo y el historial de los pasajes del virus. El virus propagado en cultivos monoestriatales de células BHK-21 procedentes del Instituto Razi, produjeron placas grandes, en tanto que el virus multiplicado en cultivos en suspensión de células BHK-21, provenientes de Brescia, produjeron placas pequeñas. El virus inicial fue producido en epitelio lingual bovino, siendo primariamente formador de placas grandes. El pasaje de este virus en monocapas de cultivos de células BHK-21 Razi, dió por resultado una población de placas predominantemente pequeñas al 10º pasaje y esta conversión era acelerada durante el pasaje en cultivos en suspensión de células Razi. La línea celular BHK de Brescia, no pareció ser susceptible a la variante de placas grandes, ocurriendo el crecimiento satisfactorio del virus tan sólo después de tener lugar la conversión a una población de placas pequeñas.

Las variantes de las placas grandes y chicas poseían características antigenicas diferentes y también fueron demostradas

*Heterogeneity of type Asia 1 foot-and-mouth disease virus and BHK-21 cells and the relationship to vaccine preparation*

The plaque forming characteristics of foot-and-mouth disease virus type Asia 1 grown for vaccine preparation were found to be different depending on the line of BHK-21 cells used for virus culture, the culture method employed and the passage history of the virus. Virus grown on monolayer cultures of BHK-21 cells originating at the Razi Institute produced large plaques whereas virus grown in suspension cultures of BHK-21 cells originating in Brescia produced small plaques. The initial virus was produced in bovine tongue epithelium and was primarily large plaque-forming. Passage of this virus in monolayer Razi cultures of BHK-21 cells resulted in a predominantly small plaque population by the 10th passage and this conversion was accelerated during passage in suspension cultures of Razi cells. The Brescia BHK cell line did not appear to be susceptible to the large-plaque variant and satisfactory growth of virus occurred only after conversion to a small plaque population had taken place.

The large and small plaque variants had different antigenic characteristics and differences in their solubility characteristics were also demonstrated. On a weight basis, the large plaque variant incorporated in a vaccine was approximately four

diferencias en sus características de solubilidad. Sobre la base de peso, la variante de placa grande incorporada en una vacuna, era aproximadamente cuatro veces más efectiva en inducir un estado inmune en bovinos, que la variante de placa pequeña. Los autores concluyeron como resultado de los estudios, que era necesario evaluar las características del virus producido en diversas líneas celulares empleando diferentes condiciones de cultivo con el fin de desarrollar procedimientos que dieran por resultado la producción de la variante viral que indujera los niveles más elevados posibles de inmunidad.

times more effective in inducing an immune state in cattle than was the small plaque variant. The authors conclude from the results of the studies that it was necessary to evaluate the characteristics of virus produced in different cell lines using different culture conditions in order to develop procedures that will result in the production of the virus variant that will induce the highest possible levels of immunity.

GOURREAU, J.M., FREMONT, A., BOURLIER, A., BRUDER, C., LAGNEAU, F.  
Texto en francés. *Rev. Méd. Vét.* 126 (3): 357-364, 1975. - Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires, 22 rue Pierre-Curie, 94700 Maisons-Alfort, France -

*Peste vesicular porcina: transmisión de la inmunidad de la cerda a los cochinitos*

Las cerdas en gestación fueron vacunadas intramuscularmente con 4 ml de vacuna inactivada contra la peste vesicular porcina, tres semanas antes del parto. Los cerdillos fueron expuestos dos o tres semanas después de nacer, mediante la inoculación de  $10^{7.0}$  DITC<sub>50</sub> de virus virulento. Un alto porcentaje de cerdillos nacidos de madres vacunadas y amamantados por ellas, resistieron la exposición, demostrando que la inmunidad se encontraba presente a la edad de 14 días, persistiendo por lo menos hasta el vigésimo primer día (21). Fué demostrado que la inmunidad era transferida por el calostro por el hecho de que los cerdillos nacidos de madres vacunadas, pero amamantados por cerdas sin vacunar, no se encontraban protegidos. Los cochinitos nacidos de madres sin vacunar, pero amamantados por cerdas vacunadas, desarrollaron cierto grado de inmunidad. Los títulos de anticuerpos neutralizantes en el suero de las cerdas, correlacionaron satisfactoriamente con los títulos en el calostro y en el suero de los cerdillos.

*Swine vesicular disease: transmission of immunity from dam to piglets*

Pregnant sows were vaccinated intramuscularly with 4 ml of inactivated swine vesicular disease vaccine three weeks prior to parturition. Piglets were challenged two or three weeks after birth by inoculation of  $10^{7.0}$  TCID<sub>50</sub> of virulent virus. A high percentage of piglets born to vaccinated sows and suckled by them resisted challenge demonstrating that immunity was shown to be transferred by the colostrum by the fact that piglets born to vaccinated sows but suckled by non-vaccinated sows were not protected. Piglets born to non-vaccinated sows but suckled by vaccinated sows developed some immunity. The titers of neutralising antibodies in the serum of sows correlated well with titers in the colostrum and in the serum of the piglets.

STAPLE, R.F., MORROW, A.W., FLETCHER, B.W.

Texto en inglés. Arch. Virol. 47 (4): 331-335, 1975. - Animal Virus Research Institute, Pirbright, Surrey, England -

*La acción de la acetiletileneimina sobre una cepa de virus aftoso inactivado almacenada a 4°C*

La acetiletileneimina (AEI) fue agregada a una suspensión de virus aftoso tipo O, cepa Hong Kong 21/70, en una concentración final de 0,05% (v/v). La suspensión fue dividida en dos lotes, manteniéndose cada lote a 26°C por 30 horas. A un lote, una segunda cantidad de AEI fue añadida pasadas 24 horas para traer la concentración a 0,1%. El volumen inactivado mediante tratamiento simple o doble, con AEI, fue cada uno dividido en tres alícuotas y la AEI fue ya sea neutralizada con tiosulfato de sodio, o eliminada mediante "desalting" sobre una columna cromatográfica. Las tercera alícuotas no fueron tratadas y sirvieron de controles. Todos los especímenes fueron luego almacenados a 4°C y examinados después de varios períodos por la presencia de los componentes 140 S, mediante fraccionamiento en gradientes de 15 a 45% de densidad de sacarosa.

El título del componente 140 S permaneció inalterable en los especímenes a los que se les había quitado la AEI, mientras que el de todos los otros especímenes se deterioraron progresivamente durante el almacenaje. A la vigésima semana de almacenaje una reducción del título del 140 S se hizo evidente en ambas concentraciones de AEI, no siendo detectable ningún material de 140 S trás 36 semanas de almacenaje. Al cabo de 43 semanas, todos los preparados fueron probados en cobayos para determinar la respuesta de anticuerpos y el grado de protección. La tendencia del componente 140 S observada en los cálculos de gradiente de densidad de sacarosa, correspondieron con la respuesta inmune en cobayos. Los resultados recalcaron el grado de inestabilidad del antígeno en la presencia de AEI tratada con tiosulfato y la evidente superioridad del antígeno "desalizado". Los preparados que contenían AEI sin tratar, provocaron una respuesta de inmunidad marginalmente mejor que los preparados de AEI tratados, siendo evidente que la deterioración del antígeno estaba correlacionada con la concentración de AEI.

*The effect of acetylethyleneimine upon a strain of inactivated foot-and-mouth disease virus stored at 4°C*

Acetylethyleneimine (AEI) was added to a suspension of foot-and-mouth disease virus type O, strain Hong Kong 21/70, in a final concentration of 0.05% (v/v). The suspension was divided into two lots and each lot was maintained at 26°C for 30 hours. To one lot, a second quantity of AEI was added after 24 hours to bring the concentration to 0.1%. The bulk inactivated by single or double treatment with AEI were each divided into three aliquots and the AEI was either neutralised with sodium thiosulphate or removed by desalting on a chromatographic column. The third aliquots were untreated and served as controls. All the samples were then stored at 4°C and examined after various times for the presence of the 140 S component by fractionation in 15 to 45% sucrose density gradients.

The titer of 140 S component remained unaltered in samples from which AEI had been removed while that of all the other samples deteriorated steadily during storage. By the 20th week of storage a reduction of the 140 S titer was obvious at both concentrations of AEI and no 140 S material was detectable after 36 weeks storage. After storage for 43 weeks, all the preparations were tested in guinea pigs to determine the antibody response and degree of protection. The trend observed in sucrose density gradient estimates of 140 S component corresponded with the immune response in guinea pigs. The results emphasized the degree of instability of antigen in the presence of thiosulphate-treated AEI and the obvious superiority of the "desalted" antigen. Preparations containing untreated AEI provoked a marginally better immune response than the treated AEI preparations and it was evident that the deterioration of the antigen was correlated with the concentration of AEI.

**bibliografía sobre enfermedades vesiculares****vesicular diseases bibliography****ANON**

Epizootiología de la fiebre aftosa en Tailandia. *Texto en inglés.* (Epizootiology of foot and mouth disease in Thailand). 14th Conf. O.I.E. Comm., Paris, Rep. No. 309, 1975. (*FMD Bull. Wellcome* 14 (4): 39, 1975).

ARSHADI, M.; FARHANGFAR, M.; MALJAI, H.

Epizootiología de la fiebre aftosa en el Irán. *Texto en español.* (Epizootiology of foot and mouth disease in Iran). 14th Conf. O.I.E. Comm., Paris, Rep. No. 305, 1975. (*FMD Bull. Wellcome* 14 (4): 40, 1975).

GRITSENKO, A.I.; SOJKO, A.I.; CHEPURKINA, A.I.

Microprueba de fijación del complemento para tipificar el virus aftoso. *Texto en ruso.* (Micro-complement fixation test for typing foot and mouth disease virus). *Veterinariya, Moscow* 1: 99-101, 1975. (*FMD Bull. Wellcome* 14 (4): 47, 1975).

MASTAN, M.B.; AMIGHI, M.; PERRINOT, F.; FIROOZI BANDPAY, M.R.; MALEKNEJAD, P.; SANTUCCI, J.; NEGI, B.S.; BHATTACHRYA, A.K.

Un estudio de diversas cepas de virus aftoso tipo Asia-1 efectuado en el Instituto Razi. *Texto en francés.* (A study of various strains of foot and mouth disease virus type Asia-1 carried out at the Razi Institute). 14th Conf. O.I.E. Comm., Paris, Rep. No. 304, 1975. (*FMD Bull. Wellcome* 14 (5): 56, 1975). [Institut Razi, Hessarak, Iran]

STROHMAIER, K.; ADAM, K.H.

Nuevos resultados acerca de las capas proteicas del virus aftoso. *Texto en inglés.* (New results concerning the coat proteins of foot and mouth disease virus). 14th Conf. O.I.E. Comm., Paris, Rep. No. 700, 1975. (*FMD Bull. Wellcome* 14 (6): 75, 1975). [Federal Research Institute for Animal Diseases, 74-Tübingen Postfach 1149, West Germany]

WITTMANN, G.

La influencia de las diversas temperaturas de almacenaje sobre la infecciosidad y antigenicidad de las cepas del virus aftoso antes y después de la inactivación. *Texto en alemán.* (The influence of different storage temperatures on the infectivity and antigenicity of foot and mouth disease virus strains before and after inactivation). *Zentbl. VetMed B* 22 (1): 18-27, 1975. [Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen, West Germany]

## BOLETIN DEL CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA

### INVITACION A LOS AUTORES

El BOLETIN del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa es una revista trimestral, bilingüe (español e inglés) del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. En ella se publican trabajos que se juzgan de interés para las actividades relacionadas con los programas de prevención o de lucha contra las enfermedades vesiculares de los animales. Los autores que deseen publicar sus trabajos en esta revista deberán someterlos a la consideración del Comité Editorial, en cualquiera de los siguientes formatos o presentaciones:

Trabajo: Investigación original, presentada en forma completa, con las divisiones tradicionales: Introducción, Material y Métodos; Resultados; Discusión; Conclusiones; Agradecimientos y Referencias. Además, debe tener un Resumen de no más de 250 palabras.

Comunicación breve: Trabajo científico completo, de no más de 6 ó 7 páginas. Los resultados y discusiones pueden presentarse juntamente con los datos y 1 ó 2 cuadros como máximo.

Comunicación preliminar: Pequeño resumen de un trabajo que está en ejecución; de 3 ó 4 páginas de extensión y con no más de 2 cuadros.

Trabajo de revisión: Formato flexible.

### INSTRUCCIONES A LOS AUTORES

1. Todos los trabajos que se presenten para su publicación en el BOLETIN deben estar escritos a máquina, a doble espacio, en una sola cara del papel, tamaño carta (28 x 22 cm).
2. En una hoja separada se detallarán: Apellido y nombre o iniciales del autor (o autores), cargo oficial y nombre de la institución (si pertenece a alguna) y dirección.
3. Las ilustraciones y cuadros, numerados con números arábigos, con sus respectivas leyendas y títulos, se incluirán en páginas aparte, numerados en forma consecutiva y agrupados al final del trabajo, con indicación del lugar donde deben ser incluidos.
4. Las referencias citadas deben presentarse en lista separada, por orden alfabético y con los números que les corresponden en el texto.
5. Los trabajos pueden enviarse en inglés o español o, de preferencia, en ambos idiomas. Los trabajos que se presenten en un solo idioma serán traducidos al otro por disposición del Comité Editorial, el que se reserva el derecho de aprobar las traducciones.
6. El Comité Editorial se reserva también el derecho de aceptar o rechazar la publicación de un trabajo, así como de realizar cualquier modificación editorial, como ser: la condensación u omisión de parte del texto, cuadros, ilustraciones o anexos. Los originales no se devuelven en ningún caso.
7. Publicado el trabajo, cada autor recibirá gratuitamente 25 separatas del mismo.

### COMITE EDITORIAL

Dr. Paul Sutmöller, Jefe de los Laboratorios, Coordinador,  
Dr. Roberto Goic, Jefe de Asesoría de Campo.  
Dr. Horacio Mónaco, Jefe de Adiestramiento e Información.  
Srta. Patricia Chain, Oficial de Comunicaciones, Secretaria.

PAN-AMERICAN FOOT-AND-MOUTH DISEASE CENTER BULLETIN

INVITATION TO CONTRIBUTORS

The BOLETIN is a quarterly bi-lingual journal of the Pan-American Foot-and-Mouth Disease Center. It publishes articles relating to all aspects of work in laboratory, field and program activities of vesicular diseases in animals. The Director invites contributors to submit their work to the Editorial Committee in the most appropriate of the following formats:

Article: full-length scientific work, reporting on original research, with traditional divisions of Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusions Acknowledgements, and References. An abstract of no more than 250 words should accompany the article.

Brief Report: short (5-7 typewritten pages) complete scientific work: results and discussion can be presented with the data, which should be limited to 2 tables.

Review Article: on both general and specific topics, flexible format.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

1. All manuscripts presented to the Boletín should be typewritten and double-spaced on one side of 28 x 22 cm paper.
2. Author's name, title, institution and address should be given on a separate sheet.
3. Figures and tables (arabic numbers) with appropriate captions and titles should be included on separate pages, numbered consecutively and attached at the end of the text with an indication of where they belong.
4. References cited should be listed separately in alphabetical order with appropriate reference numbers in the text.
5. Manuscripts may be presented in Spanish and/or English. The Editorial Committee will provide translation services on request. Final decisions on translations rest with the Editorial Committee.
6. The Editorial Committee reserves the right to accept or reject any Manuscript which is submitted, with the understanding that it is subject to editorial revision, including, where necessary, condensation of the text and omission of tabular and illustrative material, etc.
7. Authors will receive 25 reprints of articles published. In special cases, extra reprints may be arranged.

EDITORIAL COMMITTEE

Dr. Paul Sutmöller, Chief of Laboratories, Coordinator.  
Dr. Roberto Goić, Chief of Field Services.  
Dr. Horácio Mônaco, Chief of Training and Information.  
Ms. Patricia Chain, Communications Officer, Committee Secretary.