
BOLETIN

del centro panamericano de fiebre aftosa

Nº 56, enero-diciembre 1990
No. 56, January-December 1990

contenido

contents

	p.
Producción y control de vacunas antiaftosa con adyuvante oleoso, en el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa y en el Laboratorio Regional de Apoyo Animal del Ministerio de Agricultura y Reforma Agraria, Brasil	3
Production and control of oil-adjuvanted foot-and-mouth disease vaccines, at the Pan American Foot-and-Mouth Disease Center and the Regional Support Laboratory for Animal Health of the Ministry of Agriculture and Agrarian Reform, Brazil	3
— Raúl Casas Olascoaga, Paulo Augé de Mello, Daniel Abaracón, Ivo Gomes, A. Alonso F., Julio A. Mesquita, Gilfredo C. Darsie, Domingos I. Pinkoski, José Guedes Deak, Julio Guilherme Gubel, José Roberto Barbosa	
Resúmenes — Abstracts	52
Bibliografía sobre enfermedades vesiculares — Vesicular diseases bibliography	66

**PRODUCCION Y CONTROL DE VACUNAS ANTIAFTOSA
CON ADYUVANTE OLEOSO,
EN EL CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA
Y EN EL LABORATORIO REGIONAL DE APOYO ANIMAL
DEL MINISTERIO DE AGRICULTURA Y REFORMA AGRARIA, BRASIL**

**PRODUCTION AND CONTROL OF
OIL-ADJUVANTED FOOT-AND-MOUTH DISEASE VACCINES,
AT THE PAN AMERICAN FOOT-AND-MOUTH DISEASE CENTER
AND THE REGIONAL SUPPORT LABORATORY FOR ANIMAL HEALTH
OF THE MINISTRY OF AGRICULTURE AND AGRARIAN REFORM, BRAZIL**

- R E V I S I O N -

AUTORES

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
Pan American Foot-and-Mouth Disease Center
(PANAFTOSA/HPV/OPS/OMS)
Caixa Postal 589, 20001 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Raúl Casas Olascoaga
Paulo Augé de Mello
Daniel Abaracón
Ivo Gomes
A. Alonso F.
Julio A. Mesquita
Gilfredo C. Darsie

AUTHORS

Laboratorio Regional de Apoyo Animal
Regional Support Laboratory for Animal Health
(LARA), Campinas, Brasil

Domingos I. Pinkoski
José Guedes Deak
Julio Guilherme Gubel
José Roberto Barbosa

CONTENIDO – CONTENTS

Introducción – Introduction	5
1. La producción de vacuna antiaftosa inactivada con adyuvante oleoso Production of inactivated oil-adjuvanted foot-and-mouth disease vaccine	5
1.1 Selección y producción del antígeno – Selection and production of the antigen	6
1.2 Inactivación del virus – Virus inactivation	10
1.3 Adyuvantes – Adjuvants	11
1.4 Esquemas de vacunación – Vaccination schemes	13
2. Experimentos de laboratorio y de campo en pequeña escala con vacuna de adyuvante oleoso, realizados en PANAFTOSA Laboratory experiments and small scale field trials with oil-adjuvanted FMD vaccine by PANAFTOSA	14
3. Programas piloto – Pilot programs	14
3.1 Producción industrial piloto y transferencia de tecnología Semi-industrial vaccine production and transfer of technology	15
3.2 Programas piloto de vacunación y uso de la vacuna en el campo Pilot vaccination programs and field use of the vaccine	17
3.3 Análisis de costo y efectividad – Cost and effectivity analysis	21
4. Control de vacuna – Vaccine control	22
4.1 Control del proceso de producción – Production process controls	22
a) Control de células y virus – Cell and virus controls	23
b) Control de inactivación o de no infecciosidad del virus Inactivation or non-infectivity controls	25
c) Controles de emulsión – Emulsion controls	25
d) Controles bacteriológicos – Bacteriological controls	26
4.2 Control del producto final – Control of the final product	27
a) Consideraciones generales – General considerations	27
b) Control de vacunas realizado por PANAFTOSA y LARA, Campinas Vaccine control for PANAFTOSA and LARA, Campinas	33
5. Conclusiones – Conclusions	45
Agradecimientos – Acknowledgements	47
Referencias – References	48

INTRODUCCION

Uno de los objetivos de la investigación en el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (PANAFTOSA), del Programa de Salud Pública Veterinaria de la Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud (HPV/OPS/OMS), fue el desarrollo de una vacuna antiaftosa inactivada que produjese una protección de mayor duración que la vacuna utilizada en la época.

Por esa razón, a principios de los años setenta se tornó claro que ese objetivo sería logrado por el uso de una vacuna de adyuvante oleoso (16, 17). Desde entonces, una buena parte de los programas de investigación de PANAFTOSA se dirigen al desarrollo de una vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso para bovinos y porcinos (25).

Consideramos que ese objetivo ha sido básicamente cumplido. En este documento se resume el trabajo de investigación realizado en los últimos 25 años por PANAFTOSA y por el Laboratorio Regional de Apoyo Animal (LARA), en Campinas, Brasil. La mayor parte de esa información fue publicada pero, cuando es necesario, en este trabajo se incluyen datos que no fueron publicados.

El trabajo está dividido en las siguientes secciones: 1) La producción de vacuna antiaftosa inactivada con adyuvante oleoso; 2) Experimentos de laboratorio y de campo en pequeña escala; 3) Programas piloto; 4) Control de vacuna; 5) Conclusiones.

1. LA PRODUCCION DE VACUNA ANTIAFTOSA INACTIVADA CON ADYUVANTE OLEOSO

La vacuna antiaftosa producida por PANAFTOSA y por LARA en Campinas, es inactivada y adyuvada con adyuvante incompleto de Freund (adyuvante oleoso). En 1987 fue publicada una descripción detallada de los métodos de producción de vacuna (55) y en este trabajo abordamos algunos aspectos importantes, esenciales para la producción de un buen inmunógeno, tales como: a) selección y producción de

INTRODUCTION

One of the long standing research objectives of the Pan American Foot-and-Mouth Disease Center (PANAFTOSA) of the Veterinary Public Health Program of the Pan American Health Organization/World Health Organization (HPV/PAHO/WHO) was the development of an inactivated foot-and-mouth disease (FMD) vaccine that would produce a longer lasting protection than those vaccines available at the time.

In the early seventies it became clear that such objective probably could be accomplished by incorporating an oil adjuvant (16, 17) as a vaccine component. Since then, a major part of the research effort of PANAFTOSA has been directed towards the development of an oil-adjuvanted vaccine for cattle and swine (25).

Basically that objective has been accomplished. In the present review we try to summarize the research accomplishments of the last 25 years of PANAFTOSA and the Regional Support Laboratory for Animal Health (LARA), Campinas, Brazil, related to oil-adjuvanted FMD vaccines. Most of the information is already published elsewhere, but, when necessary previously unpublished data are included.

This paper is divided in the following sections: (1) Production of inactivated oil-adjuvanted vaccine; (2) Laboratory experiments and small scale field trials with oil-adjuvanted vaccine; (3) Pilot programs; (4) Vaccine control; (5) Conclusions.

1. PRODUCTION OF INACTIVATED OIL-ADJUVANTED FOOT-AND-MOUTH DISEASE VACCINE

The inactivated FMD vaccine produced by PANAFTOSA and LARA, Campinas, is adjuvanted with incomplete Freund's oil adjuvant (oil-adjuvanted). A comprehensive description of the production method has been published in 1987 (55), but we wish to add some important and essential aspects with regard to: (a) the selection and production of the antigens; (b) efficient inactivation; (c) use of mineral oil and

antígeno; b) inactivación eficiente; c) uso de adyuvantes (aceite mineral) y emulsificantes que coadyuvan a inducir una larga duración de inmunidad.

De acuerdo con "Buenas prácticas de producción" ("Good manufacturing practices"—GMP—) (44), además de los controles de esterilidad, inocuidad e inmunogenicidad sobre el producto final, son realizados controles físico-químicos y biológicos en todas las etapas del proceso de producción.

1.1 Selección y producción del antígeno

Las cepas de virus usadas para la producción de vacunas deben ser representativas de las que actúan en el área donde serán aplicadas, estables durante el proceso de replicación e inmunogénicas al ser usadas como vacunas.

Los antígenos son producidos por replicación de los virus en células BHK₂₁ Clon 13, cultivadas en tanques o en botellas rolantes (55). Esas células son controladas regularmente en cuanto a su pureza y susceptibilidad. Las suspensiones víricas son controladas para determinar los títulos infecciosos por unidades formadoras de placas (UFP) en células IB-RS-2 (13), tipificación y subtipificación por fijación del complemento (FC) (5), masa antigénica por la técnica de gradiente en cloreto de cesio (21), integridad del polipéptido VP₁ por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) (21, 24), y anticuerpos monoclonales, recientemente incorporados a los diferentes parámetros utilizados para evaluar la calidad del antígeno (38).

Las cepas de virus destinadas a la producción de vacunas deben ser estables durante el proceso de replicación viral sobre el sustrato celular e inmunogénicas. La selección de cepas de virus para la producción de vacunas debe ser regida por su adaptación al proceso productivo y ser representativas de la necesidad epidemiológica de la región o país.

Las nuevas cepas de virus aparecidas en el campo, identificadas por tipificación y subtipificación por FC (5) y por la prueba de ELISA (6), han sido estudiadas para determinar su importancia epidemiológica y significación inmunológica.

emulsifiers as adjuvants to induce a long lasting immunity.

In agreement with "Good manufacturing practices" (44), physical, chemical and biological controls are performed during all steps of the production process, in addition to the sterility, innocuity, and immunogenicity control of the final product.

1.1 Selection and production of the antigen

Virus strains used for the production of vaccines must be representative for those active in the area where the vaccines are to be used. The production strains must be stable during the replication process and must be immunogenic when used as a vaccine component.

The antigens are produced by virus replication in BHK₂₁, clone 13 cells grown in tanques or rolling bottles (55). The cells are regularly tested for purity and susceptibility. Infectivity titers of viral suspensions are determined as plaque forming units (PFU) in IB-RS-2 cells (13), tipification. Viral suspensions are also typed and subtyped by complement fixation (CF) (5), antigenic mass is determined in cesium chloride gradients (21), and integrity of the VP₁ polypeptide is determined by polyacrilamide gel electrophoresis (PAGE) (21, 24). Recently, monoclonal antibodies have been used to evaluate the antigen quality (38).

In addition to being immunogenic, virus strains to be utilized for vaccine production must be stable and remain immunogenic during the viral replication process in the BHK cell system. The selection of vaccine production strains must be based on their adaptability to the production process and the epidemiological reality of the region or country.

Newly emerging FMD strains are identified by typing and subtyping by CF (5) and by ELISA (6) and their epidemiological importance and immunological significance are determined.

Los problemas en el campo son evaluados y se realizan pruebas cruzadas simultáneas con la cepa de virus emergente frente a los sueros provenientes de bovinos vacunados con las cepas normales de producción.

El Centro posee un "Banco de Sueros" (56) provenientes de bovinos vacunados y revacunados con vacunas inactivadas hidroxisaponinadas (HS), producidas con las cepas vacunales representativas de América del Sur.

Cuando ocurre un problema en el campo, inmediatamente se realizan pruebas de seroprotección (28) o seroneutralización (33), con sueros de bovinos, a los 30 días posvacunación (DPV) y a los 30 días posrevacunación (DPR) frente al virus homólogo y la cepa emergente, y se decide sobre la conveniencia de revacunar con la cepa normal o por la inclusión de la nueva cepa en la vacuna. Cuando es necesario incluir una nueva cepa de virus, esta debe ser estudiada con respecto a su replicación y estabilidad frente al sustrato celular. Se han encontrado cepas de virus que no desarrollan bien frente a un mismo sistema celular que es adecuado para otras cepas.

Los ejemplos presentados en el Cuadro 1 muestran los resultados obtenidos con la cepa vacunal de Colombia, A₂₄ Cruzeiro, que en la primovacuna no protegió frente a la muestra de virus A Sopó-Col/85 emergente en el campo (7). Los resultados de la revacunación fueron muy diferentes, demostrando una expectativa porcentual de protección (EPP) de 79,1% relacionada con protección (66). En este caso, no se justificaría la inclusión de la muestra en la vacuna o la elaboración de una vacuna monovalente.

En 1987, las cepas vacunales de los virus del subtipo A en América del Sur eran las siguientes: en Argentina, A-79 Argentina/79; en Brasil, A₂₄ Cruzeiro-Br/55 y A-79 Venceslau-Br/76; y en Uruguay, A₂₄ Cruzeiro-Br/55.

Estudios seroepidemiológicos en muestras de campo, realizados a fines de 1986 en el laboratorio de Diagnóstico y Referencia para las Américas, en PANAFOTSA, mostraron una variación antigénica del virus de la fiebre aftosa A en relación con la cepa usual A₂₄ y A-79 de Argentina. Esa cepa de virus emergente se difundió rápidamente, provocando una epidemia en la Pampa húmeda, parte

Field problems are evaluated by simultaneous cross protection tests using the new virus against sera from cattle vaccinated with the regular vaccine strains.

For this purpose PANAFOTSA established a serum bank (56) consisting of sera from cattle that were vaccinated and revaccinated with inactivated saponin-hydroxide (SH) vaccine, produced with strains representative for South America.

When problems occur in the field the causal virus strain, as well as the homologous strains are used in serum protection tests (28) or serum neutralization tests (33) with cattle sera collected 30 days post vaccination (DPV) or 30 days post revaccination (DPR). The results of these tests are used to decide whether to revaccinate with the regular vaccine strain or to incorporate the new strain into a vaccine. In the case of the latter, the strain must be evaluated with regard to its replication and stability in the production cells. It should be mentioned that some strains have been encountered that did not perform well in systems that were adequate for other strains.

The example in Table 1 shows that sera from cattle once vaccinated with the Colombian vaccine strain A₂₄ Cruzeiro did not protect well against an emerging field strain A Sopó-Col/85 (7). The results with revaccination sera were quite different showing expected percentages of protection (EPP) in the order of 79.1% (66). This result did not justify the incorporation of the new strain in the vaccine or the preparation of a special monovalent vaccine.

In 1987 the vaccine strains of type A in South America were the following: A-79 Argentina/79 in Argentina; A₂₄ Cruzeiro-Br/55 and A-79 Venceslau-Br/76 in Brazil, and A₂₄ Cruzeiro-Br/55 in Uruguay.

Serological studies done by the Diagnostic and Reference Laboratory of PANAFOTSA in 1986 indicated antigenic variation of an emerging field strain of type A from the usual FMD strains in Argentina (A₂₄ and A-79). The antigenic variant spread rapidly and caused an extensive epidemic in the humid Pampa, the northern part and Mesopotamia of Argentina, all of Uruguay

**CUADRO 1. Banco de sueros. Indices de seroprotección (ISP) y EPP
A₂₄ Cruzeiro y A Sopó Colombia/85**

**TABLE 1. Bank of Sera. Mouse protection index (MPI) and EPP
A₂₄ Cruzeiro and A Sopó Colombia/85**

Nº de sueros Amount of sera	Antígenos / Antigens			
	A ₂₄ Cruzeiro	A Sopó/Colombia 85		
Sueros de 30 días posvacunación (DPV), 12 mayo 1981, ISP Sera of 30 days postvaccination (DPV), 12 May 1981, MPI				
1407	4.76	1.99		
897	3.86	0.90		
879	4.61	1.40		
1405	3.49	1.00		
1403	3.66	0.90		
1429	2.11	0.90		
1385	4.36	0.90		
1448	4.61	0.90		
900	2.61	1.00		
Sueros de 30 días posrevacunación (DPR), 8 sep. 1981, ISP Sera of 30 days postrevaccination (DPR), 8 Sep. 1981, MPI				
1476	>5.50	4.00		
1407	>5.50	3.75		
1462	>5.50	3.95		
1456	>5.50	1.35		
897	>5.50	1.50		
879	>5.50	1.25		
1398	>5.50	3.25		
1405	>5.50	3.75		
1408	>5.50	4.15		
1448	>5.50	3.75		
Expectativas porcentuales de protección (EPP) Expected percentage of protection (EPP)				
	30 DPV		30 DPR	
	A ₂₄ Cruz.	A Sopó-Col/85	A ₂₄ Cruz.	A Sopó-Col/85
X	91.6	50.6	99	88.6
DS	16.1	5.3	0	16.6
ESM	5.1	1.7	0	5.2
LC	82.3	47.5	99	79.1
X = Media de las expectativas porcentuales de protección (EPP). Mean of expected percentage of protection (EPP). DS = Desvío estándar. / Standard deviation. ESM = Error estándar de la media. / Mean of standard error. LC = Límite de confianza 0.95. / 0.95 confidence limit.				

norte y Mesopotamia argentina, en todo el Uruguay y en Brasil en la región sur del estado de Rio Grande do Sul. Después de estudios serológicos esa cepa fue denominada A-81 Argentina/87 (8).

El Cuadro 2 muestra los estudios de cobertura inmunológica, expresados en EPP, que las cepas vacunales de Argentina, Brasil, Uruguay y Europa podrían proporcionar frente a la cepa A-81 Arg/87 después de la vacunación o revacunación de los bovinos.

and in the south of the State of Rio Grande do Sul, Brazil. Following serological studies this strain was named A-81 Argentina/87 (8).

Table 2 lists the results of the immunological coverage following vaccination and revaccination (expressed as EPP) of the vaccine strains currently in use in Argentina, Brazil, Uruguay, and Europe when tested against the strain A-81 Arg/87.

CUADRO 2. Fiebre aftosa: cobertura de varias cepas vacunales de Europa y América del Sur
TABLE 2. Foot-and-mouth disease: coverage of several European and South American vaccine strains

Pruebas / Tests	Virus de desafío / Virus challenge				
	A-79 Venceslau	A ₅ Kelderman	A ₂₄ Cruzeiro	A-79 Arg/79	A-81 Arg/87
EPP 30 DPV suero bovinos/bovine serum vacunados con/vaccinated with A-79 Argentina/79	—	—	—	61.1	≤38.4
EPP 30 DPR suero bovinos/bovine serum revacunados con/revaccinated with A-79 Argentina/79	—	—	—	90.1	52.3
EPP 30 DPV suero bovinos/bovine serum vacunados con/vaccinated with A ₂₄ Cruzeiro-Br/55	—	—	67.5	—	≤37.5
EPP 30 DPR suero bovinos/bovine serum revacunados con/revaccinated with A ₂₄ Cruz-Br/55	—	—	91.9	—	79.3
EPP 30 DPV suero bovinos/bovine serum vacunados con/vaccinated with A ₅ Kelderman-Belg.	—	61.2	—	—	≤39.0
EPP 30 DPR suero bovinos/bovine serum revacunados con/revaccinated with A ₅ Kelderman-Belg.	—	83.3	—	—	56.0
EPP 30 DPV suero bovinos/bovine serum vacunados con/vaccinated with A-79 Venceslau-Br/76	68.8	—	—	—	≤39.0
EPP 30 DPR suero bovinos/bovine serum revacunados con/revaccinated with A-79 Venc-Br/76	91.7	—	—	—	51.3
EPP 30 DPV suero bovinos/bovine serum vacunados con/vaccinated with A ₂₄ Cruz. + A-79 Venc.	59.6	—	62.0	—	≤38.1
EPP DPR suero bovinos/bovine serum revacunados con/revaccinated with A ₂₄ Cruz. + A-79 Venc.	94.9	—	94.9	—	76.5

EPP = Expectativa porcentual de protección. Límite inferior de confianza (0,95).
 Expected percentage of protection. Lower confidence limit (0.95).

DPV = Días posvacunación. / Days postvaccination.

DPR = Días posrevacunación. / Days postrevaccination.

Fuente / Source: Alonso F., A. (8).

Se tomaron medidas inmediatas para evitar la difusión de la epidemia por medio del control del movimiento del ganado en las áreas afectadas, la prohibición de ferias y exposiciones, etc. Se prepararon vacunas monovalentes con las cepas A-81 Arg/81 y A-81 Arg/87 y, en algunos casos, esa última cepa fue incluida en la vacuna trivalente de uso corriente. En Uruguay y Rio Grande do Sul, Brasil, se efectuó una vacunación masiva, y se anticipó la etapa normal con la vacuna usual. Como resultado, se observó una nítida disminución de la incidencia y la cepa A-81 Arg/87 no fue identificada en ninguna otra área de Brasil ni en el Uruguay.

Para la selección de cepas vacunales, actualmente PANAFTOSA utiliza técnicas de mapeamiento de los epítopes del cápside viral usando anticuerpos monoclonales (38), además de las técnicas ya mencionadas.

Immediate control measures to prevent the epidemic from spreading consisted of control of cattle movements in the affected areas, prohibition of auctions and shows, etc. Monovalent vaccines were prepared with strains A-81 Arg/81 and A-81 Arg/87 and, in some cases the latter strain was incorporated into the regular trivalent vaccine. In Uruguay and Rio Grande do Sul a massive vaccination campaign was carried out and the starting date for the regular mass vaccination was advanced. As a result a clear decrease in the disease incidence occurred and strain A-81 Arg/87 was not notified in any other part of Brazil and Uruguay.

Presently, PANAFTOSA employs viral capsid epitope mapping techniques with monoclonal antibodies for the selection of vaccine strains (38), in addition to the techniques described above.

1.2 Inactivación del virus

Inactivar significa quitar al virus su capacidad de replicación, por acción sobre su genoma, pero respetando la integridad de su cápside proteico.

Durante varios años PANAFTOSA ha utilizado los denominados inactivantes de primer orden para la inactivación de antígenos para la producción de vacuna. Cuando se inició la producción de vacuna con adyuvante oleoso se usó la acetil-etilenimina (AEI) (16) y a partir de 1975, después de los trabajos realizados por Bahnemann (22) en PANAFTOSA, se utiliza la etilenimina binaria (BEI). En el LARA, Campinas, la concentración de BEI utilizada es de 1,5 mM a 37°C durante 24 horas, y en PANAFTOSA es de 3 mM a 26°C y el mismo tiempo en agitación constante.

Para calcular la cinética de inactivación se recolectan cinco muestras de suspensión viral, a las 0, 1, 2, 3 y 4 horas después de la adición del inactivante. La titulación de estas muestras permite establecer una línea de regresión lineal que indica la tasa de inactivación por minuto. Al final del proceso, la BEI es hidrolizada por la adición de tiosulfato de sodio al 2% (p/v).

1.2 Virus inactivation

Inactivation means the elimination of the replication capacity of the virus, through action on the genome, while maintaining the integrity of the protein capsid.

For many years, PANAFTOSA has utilized so called first order kinetics inactivants for the inactivation of antigens for the preparation of vaccines. Acetylenimine (AEI) (16) was used for the early production of oil-adjuvanted vaccines, but following the work of Bahnemann (22) PANAFTOSA vaccines were inactivated with binary ethylenimine (BEI). In LARA, Campinas, BEI is used at a concentration of 1.5 mM at 37°C for 24 hours. In PANAFTOSA the concentration is 3 mM at 26°C also for 24 hours under constant agitation.

For the calculation of the inactivation kinetics, five samples of the viral suspension are collected during the inactivation process at 0, 1, 2, 3, and 4 hours following the addition of the inactivant. Virus titration of these samples allow the establishment of a linear regression curve which indicates the inactivation rate per minute. At the end of the process, sodium thiosulfate at 2% (w/v) is added to hydrolyze the remaining BEI.

1.3 Adyuvantes

Adyuvante es por definición una substancia que, en forma inespecífica, potencia en intensidad y duración la respuesta inmunitaria del organismo frente al antígeno con el cual está asociado en la formulación de la vacuna.

Después de los trabajos de Cunliffe y Graves (29, 1963) utilizando el adyuvante incompleto de Freund (36) en vacunas antiaftosa, McKercher (49) y McKercher y Gailiunas (50) demostraron la eficacia de ese tipo de adyuvante en vacunas anti-aftosa para cerdos.

En 1968, PANAFTOSA, en estudios cooperativos con el Centro de Enfermedades de Animales de Plum Island (PIADC), inició estudios comparativos con vacunas de HS y de adyuvante oleoso en bovinos, porcinos y ovinos (69).

A partir de 1971, Augé de Mello y col. (16, 17, 20) de PANAFTOSA, produjeron vacunas experimentales e iniciaron una serie de experimentos controlados en el campo, que demostraron una duración de inmunidad mayor que la producida por las vacunas de HS, tanto en bovinos jóvenes como adultos primovacunados y revacunados. Para evitar posibles reacciones locales provocadas por la emulsión oleosa, la vacuna fue aplicada por vía intramuscular profunda en el tercio medio superior del pescuezo (16, 17, 20).

La formulación de vacuna para bovinos consiste de una emulsión primaria, tipo agua en aceite, en la cual la fase acuosa conteniendo el antígeno es dispersa en el seno de la fase oleosa constituida por aceite mineral con 10% de emulsificante de bajo balance hidrofílico-lipofílico (HLB).

En el inicio de los trabajos, en PANAFTOSA se utilizó como emulsificante el Arlacel A¹ que constituía un excelente coadyuvante inmunitario, pero la emulsión era poco fluida y difícil de inocular. Debido a ello, se continuó con extensos ensayos en la búsqueda de un nuevo emulsificante, lográndose una excelente formulación con el aceite mineral Marcol 52² (3) y como emulsificante

1.3 Adjuvants

By definition, an adjuvant is a substance which, associated with an antigen in the formulation of a vaccine, non-specifically potentiates the intensity and duration of the immune response of the organism against that antigen.

Following the research done by Cunliffe and Graves (29) in 1963, on the performance of incomplete Freund's adjuvant (36) in FMD vaccines, McKercher (49) and McKercher and Gailiunas (50) showed the efficacy of this type of adjuvant for FMD vaccines in swine.

In 1968, PANAFTOSA, in collaboration with the Plum Island Animal Disease Center (PIADC), started comparative vaccine studies of SH vaccines and oil-adjuvanted vaccines in cattle, swine and sheep (69).

Since 1971, Augé de Mello *et al.* (16, 17, 20) of PANAFTOSA produced experimental oil-adjuvanted vaccines and started a series of controlled field experiments which demonstrated a longer lasting immunity with them than was obtained with SH vaccine, in both young and adult cattle and at first vaccination as well as at revaccination. The vaccine was applied intramuscularly in the third upper part of the neck in order to avoid possible undesirable local reactions produced by the oil emulsion (16, 17, 20).

Oil-adjuvanted vaccine for cattle consists of a water-in-oil type primary emulsion, with the aqueous phase containing the antigen dispersed in the continuous oil base, consisting of mineral oil with 10% of a low hydrophylic lipophylic balance (HLB) emulsifier.

During the early research at PANAFTOSA, Arlacel A¹ was used as an emulsifier. This substance proved to be an excellent adjuvant, but the emulsion was too thick to handle and difficult to inject. Therefore, extensive investigations were made to develop emulsions which were more fluid, resulting in an excellent formulation which used the mineral oil Marcol 52² (3) together with

¹ Arlacel A, ICI American Inc., Atlas Chemicals Division, USA.

² Marcol 52, Exxon Corporation, USA.

el Montanide 888³ (3). La emulsión primaria producida con esta nueva formulación es más fluida, posibilitando su aplicación en bovinos con jeringas convencionales, así como una vacunación masiva, rápida y eficiente. En este sentido, cupo a PANAFTOSA realizar el desarrollo tecnológico de las vacunas antiaftosa de adyuvante oleoso para hacer factible su extensa utilización en los rebaños de bovinos.

Después de estudios comparativos (18) se estableció que la mejor formulación para porcinos sería la emulsión doble de Herbert (46), en la cual la emulsión primaria estaría dispersa en solución salina con 2% de Tween 80⁴, agente emulsificante de elevado HLB. Esta formulación demostró, en una serie de experimentos realizados en PANAFTOSA (18, 19, 39, 41), un excelente poder inmunogénico y menor reacción tisular y ganglionar (51) que la producida con emulsión primaria.

Las vacunas experimentales fueron preparadas con el emulsificador de mesa Silverson⁵ y posteriormente en un tanque emulsificador de 50 litros de capacidad, especialmente diseñado para ese fin (3). Se concluyó que, para la producción industrial, los mejores resultados eran obtenidos con un aparato del mismo principio mecánico citado anteriormente, pero colocando en la línea entre dos tanques. Este aparato emulsificador, proyectado y diseñado con la asesoría de PANAFTOSA, es utilizado en Brasil para la producción comercial de vacuna, así como en las líneas de producción de varios países de América del Sur.

Montanide 888³ (3) as the emulsifier. The primary emulsion produced with these components is quite fluid and can be injected with conventional syringes for fast and efficient mass vaccination of cattle. Thus, in a sense PANAFTOSA developed the oil-adjuvanted FMD vaccines by allowing the feasibility of large scale field use in cattle.

After comparative studies (18) it was suggested that the best formulation to be used for swine would be the so-called double emulsion described by Herbert (46). In this case the primary emulsion is dispersed in a saline solution with 2% Tween⁴, which is an emulsifier with a high HLB. In a series of experiments by workers at PANAFTOSA (18, 19, 39, 41) this vaccine formulation was shown to induce an excellent immune response with less visible tissue or lymphnode reaction than the primary emulsion (51).

The small scale experimental vaccine batches were prepared in a desk top Silverson⁵ emulsifier and later in a specially designed tanque of 50 liter capacity (3). For the industrial production of oil-adjuvanted vaccine it proved necessary to place an emulsifier based on the same mechanical principles 'in line' between two holding tanques. Such an emulsifier apparatus was projected and designed with the assistance of PANAFTOSA. Similar 'in line' industrial emulsifiers are presently used in Brazil as well as in other South American countries for the commercial production of oil-adjuvanted FMD vaccine.

³ Montanide 888, Octodocenoato de anhidromanitol, SEPPIC, París, Francia.

⁴ Tween 80, Polioxietilene de Monooleato de sorbitan. ICI American Inc., Atlas Chemicals Division, USA.

⁵ Silverson-Machine (Sales) Ltd. London, England.

³ Montanide 888, Anhydromanide octodocenate, SEPPIC Paris, France.

⁴ Tween 80, polyoxyethylene sorbitan monooleate, ICI American Inc., Atlas Chemicals Division, USA.

⁵ Silverson-Machine (Sales) Ltd., London, England.

1.4 Esquemas de vacunación

Los resultados de estos experimentos indicaron que los bovinos adultos adquieren una sólida inmunidad cuando son vacunados tres veces consecutivas con intervalos de seis meses y luego se mantiene la inmunidad por vacunaciones anuales. En bovinos menores de dos años, el esquema sería cada seis meses. Estos resultados fueron confirmados por estudios de anticuerpos circulantes en bovinos vacunados (62) y por descarga de virus por vía intradermolingual (IDL) (66). Este esquema de vacunación se utiliza actualmente en: Argentina, Entre Ríos; Brasil, Rio Grande do Sul (zona de campaña) y Distrito Federal (Brasilia); Ecuador; Paraguay; Uruguay y Venezuela. Debemos aclarar que en Brasil, con excepción del estado de Rio Grande do Sul y el Distrito Federal (Brasilia), el Gobierno Federal recomienda vacunaciones semestrales en todo el rebaño.

El esquema de vacunación recomendado para porcinos jóvenes (a partir de dos meses de edad) sería una dosis única de vacuna hasta el abate de los animales entre 5 y 5-1/2 meses de edad y vacunaciones semestrales de las matrices y reproductores (39).

Aunque ese esquema de vacunación es satisfactorio para la protección de los animales, PANAFTOSA no recomienda la vacunación sistemática de esa especie, sino vacunaciones estratégicas en situaciones de riesgo. Esta recomendación se basa en razones epidemiológicas de manejo, tecnificación de granjas porcinas, cuidados higiénico-sanitarios exigidos, etc. (14).

Estudios comparativos con vacunas de HS en ovinos demostraron que las vacunas de adyuvante oleoso producen niveles de anticuerpos de larga duración y excelente protección cuando los animales son sometidos a la descarga de virus (69). En algunos experimentos realizados por PANAFTOSA en Uruguay, fueron vacunados ovinos con vacunas de adyuvante oleoso de emulsión primaria o doble. La aplicación de la vacuna fue realizada por las vías intramuscular o intraperitoneal, y observaciones realizadas hasta los 360 DPV dieron resultados de niveles de anticuerpos elevados (PANAFTOSA, datos no publicados).

1.4 Vaccination schemes

The results of all these experiments indicated that adult cattle developed and maintained a solid immunity when vaccinated with oil-adjuvanted vaccine three times at six-month intervals followed by yearly vaccinations. Young cattle can be successfully vaccinated at six-month intervals, followed by yearly vaccinations when the animals reach two years of age. The results were confirmed by serum antibody studies of vaccinated cattle (62) and by virus challenge by intradermolingual (IDL) (66) inoculation with FMD virus. The suggested vaccination schedule presently is practiced in the Province of Entre Ríos, Argentina, in the State of Rio Grande do Sul (campaign zone) and the Federal District (Brasilia), Brazil, and in the countries of Ecuador, Paraguay, Uruguay, and Venezuela. It should be noted that with the exception of Rio Grande do Sul and the Federal District, the Federal Government of Brazil recommends vaccination of all cattle at six-month intervals.

It is recommended that young swine (over two months of age) be vaccinated only once. This vaccination provides protection until the time of slaughter at an age of 5-5 1/2 months of age. Breeding sows can be vaccinated at six-month intervals (39), but PANAFTOSA recommends only the strategic use of the vaccine in swine in high risk situations. The systematic vaccination of swine is not recommended because of swine management practices, general high technology of the pig industry, the animal health prevention programs of pig operations, etc. (14).

Comparative studies of SH vaccines and oil-adjuvanted vaccines in sheep have demonstrated that the latter induced long lasting elevated antibody levels as well as excellent protection at virus challenge (69). In a few experiments by PANAFTOSA in Uruguay sheep were vaccinated with primary and double emulsion FMD vaccines by the intramuscular or intraperitoneal route. Antibody levels remained high for all of the observation period of one year after vaccination (PANAFTOSA, unpublished data).

2. EXPERIMENTOS DE LABORATORIO Y DE CAMPO EN PEQUEÑA ESCALA CON VACUNA DE ADYUVANTE OLEOSO, REALIZADOS EN PANAFTOSA

La fase experimental de producción de vacuna en pequeña escala fue delineada para estudiar los siguientes aspectos: comportamiento inmunogénico, efectos adversos, manejo de la vacuna, esquemas de vacunación y control de vacuna. El Cuadro 3 muestra los diversos aspectos que se refieren a los trabajos publicados. En resumen, se puede decir que todos los objetivos fueron cumplidos.

De los trabajos experimentales, así como de la experiencia de campo, se puede concluir que la vacuna antiaftosa de adyuvante oleoso:

- produce una inmunidad de más larga duración y de más amplia cobertura inmunológica;
- da una inmunidad superior en animales jóvenes;
- es eficiente para la vacunación de cerdos;
- representa un costo menor para el programa de vacunación;
- es de buena aceptación por los ganaderos.

3. PROGRAMAS PILOTO

En vista de los excelentes resultados experimentales alcanzados en la primera etapa, los campos de acción fueron ampliados, y se entró en una nueva fase así constituida: producción semi-industrial en escala piloto para adiestramiento de personal y transferencia de tecnología; proyectos de vacunación en áreas demostrativas; producción de vacunas de emergencia utilizadas en varios países de la Región; y análisis del costo y efectividad.

Esos nuevos campos de acción solo pudieron ser cumplidos con la disposición de una planta bien instalada y en operación, para lo cual PANAFTOSA diseñó el equipo y desarrolló la tecnología de producción industrial piloto.

2. LABORATORY EXPERIMENTS AND SMALL SCALE FIELD TRIALS WITH OIL-ADJUVANTED FMD VACCINE BY PANAFTOSA

The experimental phase for the small scale production of oil-adjuvanted vaccines was designed to study the following aspects: immune response, adverse effects, management of the vaccine, vaccination schemes and vaccine control. Table 3 lists the publications related to these various aspects. In summary we can say that all objectives were achieved and from the information and data we can conclude that:

- oil-adjuvanted FMD vaccines induce a longer lasting immunity and wider immunological coverage than SH vaccines;
- the immune response of young animals to oil-adjuvanted FMD vaccine is superior to that of SH vaccine;
- the vaccination of swine with oil-adjuvanted FMD vaccine is effective;
- the use of oil-adjuvanted vaccine in FMD campaigns represents less costs for the vaccination program;
- oil-adjuvanted FMD vaccine is well accepted by livestock owners.

3. PILOT PROGRAMS

Because of the excellent experimental results obtained during the first stage of the field experiments, the field activities were increased, and a new phase was started comprising the following: pilot scale semi-industrial vaccine production for the training of personnel and transfer of technology; vaccination projects in demonstration areas; vaccine production for emergency usage; and cost and effectivity analysis.

In order to achieve these new objectives the PANAFTOSA staff designed the equipment and developed the required technology for the installation of a semi-industrial vaccine production facility.

CUADRO 3. Experimentos de laboratorio y de campo en pequeña escala con vacuna antiaftosa de adyuvante oleoso realizados en PANAFTOSA. N° de referencias^a

1. Comportamiento inmunogénico:
 - Bovinos jóvenes, inmunidad pasiva y activa
 - Bovinos adultos
 - Porcinos, ovinos
2. Efectos adversos:
 - Local, general y productividad
 - Inspección veterinaria en mataderos
 - Estudios anátomo-patológicos
3. Manejo de la vacuna:
 - Vacunación simultánea, otros manejos
 - Vías de aplicación
 - Bovinos (subcutánea e intramuscular)
 - Porcinos (subcutánea, intramuscular e intraperitoneal)
4. Esquemas de vacunación:
 - Bovinos jóvenes y bovinos adultos
 - Porcinos
5. Control de vacuna

^a Refs. 1, 2, 3, 11, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 31, 39, 41, 42, 43, 51, 58, 61, 69.

3.1 Producción industrial piloto y transferencia de tecnología

La producción de vacuna en PANAFTOSA fue aumentando paulatinamente a medida que fue necesario para cumplir con los programas piloto de vacunación. De 36.000 dosis multivalentes de vacuna distribuidas en 1976, se llegó a 7.670.000 en 1988 que fue el máximo alcanzado. Actualmente la industria de varios países (Argentina, Brasil, Colombia, Paraguay, Uruguay) produce la vacuna oleosa en escala creciente. De esta forma, PANAFTOSA está cumpliendo con uno de los objetivos principales del desarrollo de ese tipo de vacuna.

La transferencia de tecnología de la producción de vacunas, tanto para profesionales del sector oficial como privado, se realizó por medio de cursos y seminarios y por entrenamiento en servicio. Siempre que fue necesario, se realizaron visitas de los profesionales de PANAFTOSA a las plantas industriales y de los profesionales de la industria al Centro.

TABLE 3. Laboratory experiments and small scale field trials with oil-adjuvanted FMD vaccine by PANAFTOSA. Bibliographic references^a

1. Immune response:
 - Young cattle, passive and active immunity
 - Adult cattle
 - Swine and sheep
2. Adverse effects:
 - Local, general and productivity
 - Veterinary inspection at slaughter
 - Anatomical and pathological studies
3. Vaccine management:
 - Simultaneous vaccinations, other management
 - Routes of vaccination
 - Cattle (subcutaneous, intramuscular)
 - Swine (subcutaneous, intramuscular, and intraperitoneal)
4. Vaccination schemes:
 - Young cattle, adult cattle
 - Swine
5. Vaccine control

^a Refs. 1, 2, 3, 11, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 31, 39, 41, 42, 43, 51, 58, 61, 69.

3.1 Semi-industrial vaccine production and transfer of technology

Vaccine production at PANAFTOSA was gradually increased to cover the needs of the pilot vaccination programs. From 36,000 doses distributed in 1976, the maximum of 7,670,000 doses was reached in 1988. Oil-adjuvanted FMD vaccine production in the various countries (Argentina, Brazil, Colombia, Paraguay and Uruguay) is increasing. Thus PANAFTOSA has reached one of its principal objectives with this type of vaccine.

The transfer of vaccine production technology both for professionals in the official and in the private sector was achieved by means of courses, seminars, and by in-service training. If necessary the technical staff of PANAFTOSA visited industrial production plants and vice versa.

Merece mención especial el Programa de Adiestramiento en Salud Animal para América Latina, denominado PROASA, ejecutado por la OPS con la participación del Banco Interamericano de Desarrollo (BID) y de los países de la Región.

En el marco del PROASA, cuya actividad se extendió desde el 24 de septiembre de 1981 hasta el 30 de junio de 1985, se realizaron 13 cursos en varios países y dos seminarios sobre producción y uso de vacuna con adyuvante oleoso. También fueron elaborados los manuales correspondientes que fueron entregados a los participantes y a todos los laboratorios productores que lo solicitaron (55). Tanto los cursos específicos de producción de vacunas como el entrenamiento en servicio, estuvieron siempre abiertos a profesionales del área privada.

De los institutos oficiales: el LARA, Campinas, perteneciente al Ministerio de Agricultura y Reforma Agraria de Brasil y el Instituto de Pesquisas Veterinarias Desidério Finamor (IPVDF), perteneciente a la Secretaría de Agricultura de Rio Grande do Sul, Brasil, fueron directamente asesorados por PANAFTOSA en la instalación de los laboratorios y comienzo de las actividades, y su personal fue capacitado para la producción y control de calidad. Ambos siguen estrictamente la metodología de producción de PANAFTOSA. LARA, Campinas, se convirtió en el principal proveedor de vacunas para la campaña de Rio Grande do Sul. Su producción total pasó de 200 mil dosis en 1983 para 9.242.000 dosis en 1989.

Prácticamente todos los laboratorios privados de producción de vacuna enviaron profesionales y técnicos para entrenamiento en PANAFTOSA y/o LARA, Campinas, donde acompañaron todas las etapas del proceso de producción.

La incorporación de los laboratorios privados a la producción de vacuna oleosa fue paulatina. El Cuadro 4 muestra la producción de vacuna oleosa en Brasil hasta el año 1987. En 1990, todos los laboratorios de Brasil tienen registradas y varios están produciendo vacunas con adyuvante oleoso.

En 1989, en Argentina se produjeron 6.100.000 dosis de vacuna de adyuvante oleoso y la tendencia es a aumentar. Brasil produjo 37 millones de dosis, lo que permitió ampliar los programas de vacunación con este tipo de vacuna. Colombia

Special mention must be made of the PROASA program (Animal Health Training Program for Latin America), executed by PAHO with the participation of the Inter-American Development Bank (IDB) and the countries of the Region.

Between September 24, 1981 and June 30, 1985, within the PROASA framework, 13 courses and seminars were held in several countries on the production and use of oil-adjuvanted FMD vaccine. Also, manuals were prepared on these subjects and given to the participants of the courses and seminars and, on request, to vaccine production laboratories (55). Both the participation in specific courses as well as the in-service training were made available for the technical staff of the private sector.

LARA, Campinas (a laboratory of the Ministry of Agriculture and Agrarian Reform of Brazil in the State of São Paulo) and the Veterinary Research Institute Desidério Finamor (IPVDF) of the Secretariat of Agriculture of the State Rio Grande do Sul, Brazil, received direct assistance from PANAFTOSA for the installation of oil-adjuvanted vaccine production laboratories, the initiation of production, and the training of personnel in the production and quality control of oil-adjuvanted FMD vaccine. Both laboratories strictly adhere to the production methodology of PANAFTOSA. LARA, Campinas, became the principal supplier of the vaccines for the FMD campaign in Rio Grande do Sul; production started with of 200,000 doses in 1983 and increased to 9,242,000 doses in 1989.

Essentially all private production laboratories have sent professionals and technicians to PANAFTOSA and/or LARA, Campinas, for training and observation of all phases of the production process.

In Brazil, private production laboratories started the production of oil-adjuvanted vaccine gradually over time as shown in Table 4 until the year 1987. In 1990 all FMD vaccine producers in Brazil have registered oil-adjuvanted vaccines with the Ministry of Agriculture and Agrarian Reform and several are producing such vaccines.

In 1989, a total of 6,100,000 doses of oil-adjuvanted FMD vaccine were produced in Argentina and the number is increasing. Brazil produced

CUADRO 4. Producción de vacuna antiaftosa de adyuvante oleoso. Brasil, 1976-1987**TABLE 4. Production of foot-and-mouth disease oil-adjuvanted vaccine. Brazil, 1976-1987**
(miles de dosis / thousand doses)

Año Year	Laboratorios oficiales Official laboratories			Laboratorios particulares Private laboratories				Total
	PANAFTOSA ^a	LARA	IPVDF	COOPER	IRFA	NOLI	RHODIA	
1976	36	—	—	—	—	—	—	36
1977	91	—	—	—	—	—	—	91
1978	99	—	—	—	—	—	—	99
1979	1.083	—	—	—	—	—	—	1.083
1980	1.400	—	—	—	—	—	—	1.400
1981	1.100	—	—	—	—	—	—	1.100
1983	1.800	200	—	200	—	70	—	2.270
1984	5.400	500	1.000	1.300	3.100	50	—	11.350
1985	5.600	7.000	1.800	6.500	1.200	100	—	22.200
1986	6.500	6.100	2.900	1.500	1.000	—	100	18.100
1987	7.200	7.800	1.500	1.400	3.200	—	2.200	23.300
Total	32.209	21.600	7.200	10.900	8.500	220	2.300	82.929

^a Vacuna utilizada solamente en proyectos especiales a solicitud de los gobiernos de los países.

Vaccine only used in special projects at the requests of Governments.

Fuente / Source: PANAFTOSA & LARA, Campinas, 1988.

produjo 9.170.540 dosis y la tendencia es que el total de la producción nacional sea de vacuna de adyuvante oleoso. Paraguay produjo 1.219.000 dosis e importó 946.000 dosis de vacuna de PANAFTOSA. Uruguay importó 150.000 dosis de vacuna de PANAFTOSA para un proyecto especial en la cuenca lechera cerca de Montevideo. Por decisión del gobierno de Uruguay, toda la vacuna pasará a ser del tipo de adyuvante oleoso. Venezuela importó 2.100.000 dosis de vacuna oleosa de PANAFTOSA.

3.2 Programas piloto de vacunación y uso de la vacuna en el campo

La primera prueba controlada en el campo fue realizada por PANAFTOSA entre los años 1972 y 1976, sobre un rebaño de 2000 bovinos, en un establecimiento del Ministerio de Agricultura, en Bagé, estado de Rio Grande do Sul, Brasil. En ese experimento se estudiaron todos los aspectos inherentes al uso extensivo de la vacuna en el campo (16, 17, 20).

37 million doses oil-adjuvanted vaccine, which is sufficient for the vaccination programs without the need for the PANAFTOSA vaccine. Colombia produced 9,170,540 doses and it is the intention that all national FMD vaccine will be oil-adjuvanted. Paraguay produced 1,219,000 doses and imported 946,000 doses of PANAFTOSA vaccine. Uruguay imported 150,000 doses of PANAFTOSA vaccine for a special project in the dairy region near Montevideo. The government of Uruguay recently decided that all FMD vaccines will be oil-adjuvanted. Venezuela imported 2,100,000 doses of PANAFTOSA oil-adjuvanted vaccine.

3.2 Pilot vaccination programs and field use of the vaccine

PANAFTOSA conducted the first series of controlled field experiments during the period 1972-1976, using a herd of 2,000 cattle at an experiment station of the Ministry of Agriculture in Bagé, Rio Grande do Sul, Brazil. All aspects of field usage of the vaccine were studied (16, 17, 20)

Se estudió el manejo de la vacuna, vías de inoculación, eventuales reacciones locales y generales, costos (11), así como la respuesta inmunitaria de la población bovina en todas las fajas de edad. Se verificó la factibilidad de proteger adecuadamente toda la población mediante vacunación semestral a los bovinos menores de dos años y anual a los bovinos adultos (16). Ese sistema de vacunación fue confirmado por todos los experimentos de campo posteriores, abarcando grandes masas de bovinos.

El experimento de Bagé se fue extendiendo por el estado de Rio Grande do Sul, "como una mancha de aceite", en tal forma que hoy abarca la casi totalidad del estado, siendo actualmente vacunadas con vacuna de adyuvante oleoso más de 11 millones de cabezas de ganado.

La segunda área demostrativa de campo comenzó en 1977 en Valença, área lechera del estado de Rio de Janeiro, sobre 46 mil bovinos de todas las edades (58).

También en ese año comenzó un área demostrativa en la cuenca lechera de Uruguay, en convenio con la Cooperativa Nacional de Productores de Leche, sobre un total de 52 mil cabezas de ganado lechero, que luego fue aumentando gradualmente y que hoy supera el número de 100 mil animales vacunados con vacuna de adyuvante oleoso. En 1990, la vacunación con vacuna antiaftosa oleosa, elaborada por los laboratorios privados, se extendió a todos los rebaños de la cuenca lechera de Montevideo.

Los trabajos de campo se fueron multiplicando en varios países de América del Sur y los Cuadros 5 y 6 muestran la situación hasta 1987.

En 1980 se inició el proyecto del Distrito Federal de Brasilia, Brasil, con una población de 70 mil bovinos y hasta el presente se ha logrado pleno éxito, con ausencia permanente de la enfermedad en 10 años del programa demostrativo.

Durante los años de realización de estos programas hubo muchas oportunidades de estudiar el comportamiento inmunitario de la población, ya sea por el estudio de los niveles de anticuerpos, como por la morbilidad del rebaño general y la tasa de ataque de los rebaños afectados (43).

El Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA), de Argentina, durante cinco años

in those trials, including management of the vaccine, routes of inoculation, local and general reactions, and cost factors (11), as well as the population immune response of all age groups. It proved feasible to protect effectively all of the population. When cattle under two years of age were vaccinated at six-month intervals and all adult cattle were vaccinated at yearly intervals they were adequately protected (16). The effectiveness of this vaccination scheme was confirmed in all later field experiments with large number of cattle.

The Bagé field trial was gradually extended to cover nearly all of the cattle of the State of Rio Grande do Sul with, at present, a total of more than 11 million head of cattle vaccinated with oil-adjuvanted FMD vaccine.

In 1977, a second field demonstration area was started in Valença, a dairy area in the State of Rio de Janeiro, covering 46 thousand cattle of all ages (58).

In the same year another demonstration area was started in the dairy region around Montevideo, Uruguay. For this purpose PANAFTOSA and the National Dairy Producers Cooperative entered into an agreement to vaccinate a total of 52,000 cattle. This number gradually increased and presently more than 100,000 cattle are vaccinated with oil-adjuvanted FMD vaccine. In 1990, private industry provided oil-adjuvanted vaccine needed to vaccinate all of the remaining cattle in the dairy region of Montevideo.

The field trials were multiplied in various countries of the South American continent. Tables 5 and 6 show the situation until 1987.

In 1980, a project was initiated in the Federal District of Brasilia, Brazil, comprising a cattle population of 70,000 cattle. This program has been an eminent success as shown by the absence of FMD in the demonstration area for the last 10 years.

During the years that these programs were underway there were several opportunities to evaluate the population immune response, either by specific antibody studies or by comparing the morbidity of the population and the attack rate in affected herds (43).

The National Animal Health Service (SENASA) of Argentina, made a five-year study in the District

CUADRO 5. Planes piloto de vacunación antiaftosa con vacuna de adyuvante oleoso. América del Sur, 1976-1987

TABLE 5. Pilot projects of vaccination with oil-adjuvanted foot-and-mouth disease vaccine. South America, 1976-1987

Año inicio Starting year	País Country	Plan Project	Cobertura rebaños Herd coverage	Bovinos Cattle
1976	Brasil	Bagé	1.996	400.000
1977	Argentina	Hipólito Yrigoyen ^a	149	22.000
1977	Brasil	Valença ^b	540	46.000
1977	Uruguay	Montevideo	459	52.000
1978	Perú	Lima	113	3.000
1979	Brasil	Roraima	241	110.000
1979	Brasil	Distrito Federal	712	62.000
1979	Bolivia	Cochabamba	3.500	37.000
1980	Paraguay	Paraguarí	767	32.000
1980	Colombia	Leticia	91	6.000
1981	Colombia	Urabá	350	35.000
1984	Ecuador	<i>c</i>	16.438	376.000
1985	Venezuela	<i>d</i>	1.081	301.618
1985	Venezuela	<i>e</i>	—	1.400.000
1987	Argentina	Ayacucho	1.605	690.000
Total			28.102	3572.618

^aVacunación general cada seis meses. Terminó en 1981. / General vaccination every six months. Ended in 1981.

^bTerminó en 1980. / Ended in 1980.

^cSto. Domingo de los Colorados y áreas en Carchi, Imbabura y Pichincha.

Sto. Domingo de los Colorados and areas in Carchi, Imbabura and Pichincha.

^dSucre, Bolívar, Monagas & TFD Amacuro.

^eVarias áreas en Barinas, Lara y Zulia. / Several areas in Barinas, Lara and Zulia.

Fuente / Source: Goiç M., R. (43).

comparó, en Hipólito Yrigoyen, el sistema de vacunación semestral con vacuna oleosa contra las vacunaciones clásicas con vacunas de HS cada cuatro meses (37). El primer sistema se aplicó en 20 mil bovinos de 149 predios y el segundo en 120 mil bovinos de 340 predios. La tasa de morbilidad para los bovinos vacunados con vacuna oleosa fue de 4,9% por predio y de 0,6% por bovinos y para la vacuna de HS de 18,1% y 5,6% respectivamente, demostrando la vacuna oleosa una ventaja significativa.

En el municipio de Bagé, donde comenzó el experimento de Rio Grande do Sul, Brasil, el impacto de la vacunación predominantemente

de Hipólito Yrigoyen, and compared a vaccination scheme using oil-adjuvanted vaccine at six-month intervals with the normally used scheme of vaccination with the classical SH vaccines at four-month intervals (37). The oil-vaccine scheme was used in 20,000 cattle on 149 farms and the SH vaccine in 120,000 cattle on 340 farms. The morbidity rate of the population vaccinated with oil-adjuvanted vaccine was 4.9% per farm and 0.6% for the cattle. These figures for the population vaccinated with SH vaccine were 18.1% and 5.6%, respectively. Thus the scheme using the oil-adjuvanted vaccine had significant advantages.

The impact of the use of oil-adjuvanted vaccine

CUADRO 6. Estimación de bovinos en programas de lucha antiaftosa vacunados con vacuna de adyuvante oleoso. América del Sur, 1987

TABLE 6. Estimate of cattle in foot-and-mouth disease programs vaccinated with oil-adjuvanted vaccine. South America, 1987

País Country	Población bovina/Cattle population		
	Total ^a	Vacuna oleosa Oil vaccine ^b	%
Argentina	52.700.000	7.000.000	13.3
Bolivia	600.000	200.000	33.3
Brasil	85.000.000	17.000.000	20.0
Colombia	16.400.000	1.000.000	6.1
Ecuador	3.800.000	450.000	11.8
Paraguay	7.400.000	1.000.000	13.5
Uruguay	9.900.000	100.000	1.0
Venezuela	11.800.000	1.300.000	11.0
Total	187.000.000	28.050.000	14.9

^a Población en programa de lucha antiaftosa.

Population in foot-and-mouth disease programs.

^b Cálculo según disponibilidad de vacuna y 1,3 dosis x bovino/año.

Calculated according to availability of vaccine and 1.3 doses x cattle/year.

Fuente / Source: COSALFA XV & PANAFTOSA.

oleosa en los últimos años es demostrado en el Cuadro 7. En esta área se iniciaron los experimentos de campo pero actualmente predomina el uso de la vacuna oleosa. Durante la gran epidemia de fiebre aftosa de virus tipo O₁ en el año de 1980, que cubrió ese estado, los bovinos vacunados con vacuna oleosa en Bagé tuvieron 20 veces menos enfermos que los vacunados con vacuna de HS (31).

En el área demostrativa de campo de la cuenca lechera del Uruguay, durante 10 años seguidos nunca se registró la enfermedad en la población bovina del programa, a pesar de su ocurrencia anual en el país y esporádica en la cuenca lechera, incluyendo la extensa epidemia de virus O₁ de 1980. Con motivo de la epidemia de virus A de 1987, la fiebre aftosa se hizo presente en cuatro tambos, manifestándose solo en 27 bovinos, clasificados en ocho terneros no vacunados, 18 sobre año y una vaquilla. Significó una morbilidad general de 3 x 10.000, mientras que en el resto de la

in the Municipality of Bagé, Rio Grande do Sul, Brazil, for the last several years is demonstrated in Table 7. In this area the original field trials started, but presently, oil-adjuvanted vaccine is used predominantly in the area. During the extensive outbreak of FMD caused by type O₁, which covered all of the State of Rio Grande do Sul during 1980, the cattle vaccinated with oil-adjuvanted FMD vaccine had 20 times less cases of FMD than those vaccinated with SH vaccine (31).

During the last 10 years no case of FMD has been registered in the dairy region of Montevideo, Uruguay, among cattle covered by the oil-adjuvanted vaccine program, even though the disease occurred in the rest of the country, including the extensive O₁ type outbreak in 1980. During the epidemic of virus type A in 1987 the disease occurred on four farms on which oil-adjuvanted vaccine had been used in a total of 27 cattle: in 8 not vaccinated calves, 18 one year old cattle and one heifer, signifying a morbidity of 3 x 10,000 in the

cuenca, vacunada con vacuna de HS, fue de 20 x 10.000. La tasa de ataque dentro de los rebaños afectados fue de 3 y 7 x 100, respectivamente (43). El Cuadro 8 ilustra sobre la morbilidad general de fiebre aftosa, según el sistema de vacunación en la cuenca lechera de Uruguay.

population vaccinated with oil-adjuvanted vaccine, while in the rest of the dairy region vaccinated with SH vaccine experienced a morbidity of 20 x 10,000. The attack rate within the affected herds were 3 and 7 x 100, respectively (43). Table 8 illustrates the morbidity of FMD in the dairy region of Montevideo, Uruguay, depending upon the vaccine used.

3.3 Análisis de costo y efectividad

Tomando datos de vacunación antiaftosa en Paraguay, en 1976, con vacuna HS, Astudillo y Augé de Mello (11) concluyeron que la aplicación de la vacuna con adyuvante oleoso produciría mejor efectividad con menor costo.

Sin computar el valor de la vacuna y la operación de vacunación, que envuelve mano de obra de empleados y otros gastos, la utilización de vacuna

3.3 Cost and effectivity analysis

Astudillo and Augé de Mello (11) used 1976 data from the FMD campaign in Paraguay (in which SH vaccine was used) and concluded that oil-adjuvanted vaccine would have a higher effectivity at lower costs.

Even without computing the cost of the vaccine and the vaccination operation itself, which includes labor and other costs, the use of oil-

CUADRO 7. Rebaños afectados por fiebre aftosa en Bagé, Rio Grande do Sul, Brasil. 1970–1990

TABLE 7. Cattle herds affected by foot-and-mouth disease. Bagé, Rio Grande do Sul, Brazil. 1970–1990

Año Year	Virus	Ene Jan	Feb Feb	Mar Mar	Abr Apr	May May	Jun Jun	Jul Jul	Ago Aug	Sep Sep	Oct Oct	Nov Nov	Dic Dec	Total
1970		37	13	15	0	15	25	26	0	20	23	37	40	251
1971		12	35	24	36	19	2	7	7	4	0	0	19	165
1972	A,C	7	0	1	1	6	4	3	1	3	1	1	2	30
1973	C	0	3	6	13	10	5	1	1	1	0	0	0	40
1974	C	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	4
1975		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1976	O,A	0	0	0	1	11	32	18	16	4	3	7	4	96
1977	O,A	12	24	29	28	10	4	0	0	0	0	0	1	99
1978	O	1	0	2	16	6	2	1	0	0	0	0	0	28
1979	A	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2
1980	O	3	4	8	31	113	29	7	8	3	1	0	0	207
1981		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1982		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1983		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1984		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1985		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1986		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1987	O	0	0	0	0	3	1	1	0	0	0	0	0	5
1988		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
1989		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1990		0	0	0	0	0	0	0	0					
Total		72	79	76	131	194	104	64	33	35	28	45	67	928

Fuente / Source: SECOFA, Rio Grande do Sul, Brasil.

CUADRO 8. Morbilidad general por fiebre aftosa en bovinos, según sistema de vacunación. Canelones, Florida y San José, Uruguay, 1987

TABLE 8. Foot-and-mouth disease. General morbidity according to vaccination system. Canelones, Florida and San José, Uruguay, 1987

Departamento Department	Sistema de vacunación / Vaccination system					
	Vacuna hidróxido de aluminio Aluminum hydroxide vaccine			Vacuna oleosa Oil vaccine		
	Total No.	No.	Enfermos Diseased (10 ⁴)	Total No.	No.	Enfermos Diseased (10 ⁴)
Canelones	154 790	234	15	15 210	0	0
Florida	525 710	909	17	54 290	9	2
San José	252 330	734	29	17 670	18	10
Total	932 830	1877	20	87 170	27	3

Fuente / Source: Goñi M. R. (43).

oleosa presenta claras ventajas. Con el uso del esquema de dos vacunaciones anuales en una propiedad (uno parcial y otro total), la movilización de los animales será mucho menor, representando aumento de peso, menor riesgo de fracturas, abortos, etc., comunes en los rodeos para vacunación.

Por esos motivos, la aceptación de la vacuna oleosa ha sido excelente por parte de los ganaderos, y cada vez es mayor el número de los que desean entrar en los programas piloto de vacunación, sobre todo aquellos de áreas vecinas a las áreas piloto que conocen verdaderamente el sistema y sus resultados.

Un análisis del costo de la vacunación en Rio Grande do Sul y Uruguay mostró que, según los esquemas de vacunación oleosa y de HS, es favorable el que usa vacuna oleosa (Cuadro 9).

4. CONTROL DE VACUNA

4.1 Control del proceso de producción

La calidad o la potencia de las vacunas anti-aftosa depende de varias etapas en el proceso de producción. De acuerdo con los conceptos de "Buenas prácticas de producción", los controles deben ser

adjuvanted vaccine would have other clear advantages. Oil-adjuvanted vaccine requires only two vaccinations per year (one general vaccination and one vaccination of the young cattle only). Because the cattle would be moved less frequently, they would gain more weight and the risk of fractures, abortions, etc. commonly caused by vaccination roundups would decrease.

For these reasons the acceptance of oil-adjuvanted vaccine by the cattle industry has been excellent. Many farmers expressed their wish to enter the pilot programs, particularly those in the vicinity of the test area who were able to observe the system and the results.

An analysis of vaccination costs in the State of Rio Grande do Sul, Brazil and of Uruguay is presented in Table 9. The results of these studies show that the scheme using oil-adjuvanted vaccine is more favorable than the SH vaccination scheme.

4. VACCINE CONTROL

4.1 Production process controls

The final quality or potency of an FMD vaccine depends on the proper execution of many steps in the production process. In conformance with the

realizados en cada una de estas etapas para asegurar la integridad del producto final (44).

Las vacunas producidas en PANAFTOSA y LARA son sometidas a control durante el proceso producción y sobre el producto final.

a) Control de células y virus

A pesar de los enormes avances logrados en el conocimiento de virus y células por medio de las nuevas técnicas bioquímicas y biotecnológicas, la producción de un buen antígeno es todavía un proceso fundamentalmente empírico. El control sistemático y permanente tiende a detectar y evitar desvíos que aparten el proceso de producción de procesos anteriores en los cuales el producto final, la vacuna, alcanzó la calidad requerida.

concepts of "Good manufacturing practices" (GMP) each step must be controlled to insure the quality and potency of the final product (44). Therefore, the vaccines produced by PANAFTOSA and LARA, Campinas, are submitted to numerous controls both during the production process and as the final product.

(a) Cell and virus controls

The production of a good antigen remains more art than science in spite of new biochemical techniques, biotechnology, and the enormous advances in our knowledge of the virus and cells. Systematic and continuous controls serve to detect and avoid deviations from the production process which normally would result in a vaccine of the required quality.

CUADRO 9. Costo de vacunación antiaftosa para un rebaño de 400 bovinos^a con vacuna de hidróxido de aluminio o vacuna oleosa. Rio Grande do Sul (Brasil) y Uruguay. 1988

TABLE 9. Cost of foot-and-mouth disease vaccination of 400 cattle^a with aluminum hydroxide or oil vaccine. Rio Grande do Sul (Brazil) and Uruguay. 1988

	Hidróxido Hydroxide	%	Oleosa Oil	%
Rio Grande do Sul, Brasil, Cruzados (Cz\$)				
Valor de la dosis de vacuna/Cost per vaccine dose	37.00		49.70	
Valor de 400 dosis de vacuna/Cost of 400 vaccine doses	14.800.00	85	19.880.00	88
Mano de obra/día ^b / Labor costs per day ^b	2.600.00	15	2.600.00	12
Costo total de una vacunación / Total cost per vaccination	17.400.00		22.480.00	
Costo anual ^c / Annual cost ^c	52.200.00		29.898.00	
Costo vacunación año/bovino / Cost vaccination year/cattle	130.50		74.74	
Uruguay, Pesos (\$)				
Valor de la dosis de vacuna/Cost per vaccine dose	63.70		100.00	
Valor de 400 dosis de vacuna/Cost of 400 vaccine doses	25.480.00	83	40.160.00	88
Mano de obra/día ^b / Labor costs per day ^b	5.400.00	17	5.400.00	12
Costo total de una vacunación / Total cost per vaccination	30.880.00		45.560.00	
Costo anual ^c / Annual cost ^c	92.640.00		60.595.00	
Costo vacunación año/bovino / Cost vaccination year/cattle	231.00		151.48	

^aValores en el mes de mayo. / Price in May.

^bSalario diario de 1 administrador, 1 capataz y 3 camperos. / Daily wage of 1 administrator, 1 foreman, 3 laborers.

^cTres vacunaciones con hidróxido de aluminio y 1,33 con oleosa. / Three vaccinations with aluminum hydroxide and 1.33 with oil vaccine.

Fuente / Source: R. Goic M. (43).

El medio de cultivo para crecimiento celular no debe cambiar su composición y formulación para que las líneas celulares se mantengan también dentro de sus características y lo más estables posible. Todos los componentes del medio de cultivo deben ser controlados. Si alguno de los componentes del medio es de insuficiente calidad o es tóxico, el cultivo de células se resentirá. Si, por otra parte, se incorporan al medio de cultivo elementos que lo enriquezcan demasiado, puede aumentar mucho el número de células, pero sus características pueden alterarse en forma de hacerse menos susceptibles o hacer que muden las propiedades inmunogénicas del virus. El medio de cultivo usado por PANAFTOSA y LARA está descrito en "Producción, control de calidad y uso de vacunas con adyuvante oleoso contra la fiebre aftosa" (55).

Las cepas virales seleccionadas para la producción de vacunas constituyen verdaderas poblaciones heterogéneas y con una marcada tendencia a la variación.

Las líneas celulares susceptibles, que constituyen el sustrato para la replicación viral, también constituyen poblaciones celulares heterogéneas, con tendencia a la variación que dependerá en gran medida de la forma en que sean manejadas y los medios de cultivos utilizados.

La producción de antígenos de alto poder inmunogénico para vacunas surge de un delicado proceso biológico, cuyo equilibrio debe ser controlado en todo momento. Así, **producir es controlar** y los controles de materia prima, de las cepas de virus y células, y de proceso son tan importantes como los controles del producto final.

El virus replicado sobre células en suspensión tiene mayor riesgo de sufrir variaciones que afectan sus características antigénicas (26). El virus es estudiado en cuanto a su significación inmunogénica y capacidad de replicar en cultivos industriales sin sufrir desvíos.

Los parámetros de control: título infectante, título de FC, subtipificación, masa antigénica, integridad de VP₁, etc. son indicadores parciales de la calidad del virus. En el pasado se sobrevaloraron algunos parámetros individuales y se tomaron como criterio para formulación de las vacunas. Hoy sabemos que su valor principal es decidir si

In order to maintain the cell lines as stable as possible and to avoid changes of its characteristics, the composition or formulation of the culture media used for growing the cells must not change. All components of the culture media must be controlled. If any component is of insufficient quality or proves to be toxic the cell culture will not grow adequately. On the other hand, if elements are incorporated which enrich the medium too much, the number of cells can increase, but their characteristics can change in such manner that they become less susceptible, with possible changes in the immunogenic properties of the virus. The culture media used by PANAFTOSA and LARA, Campinas, are described in "Producción, control de calidad y uso de vacunas con adyuvante oleoso contra la fiebre aftosa" (55).

Virus strains selected for vaccine production are very heterogenous populations, with a marked tendency towards variation.

The susceptible cell lines in which the virus replicates also consist of cell populations, also with a tendency towards variation, that can be influenced by the management of the cultures and the growth media used.

The production of highly immunogenic vaccine antigens is the result of a delicate biological process of which the equilibrium must be checked at all times. Thus, **production means control**. Continuous overall control of the production process, including basic materials, cells, and virus used, is as important as the controls of the final product.

Virus replication in suspended cell cultures carries the greatest risk of variations affecting the immunogenic characteristics of the vaccine antigen (26). Thus the vaccine strain must be evaluated with regard to its immunological significance in relation to the strains acting in the field as well as its capacity to replicate and its stability in industrial systems.

The control parameters, partially indicating the quality of the virus, are the following: infectivity titer, CF titer, subtypification, antigenic mass, integrity of VP₁, etc. In the past some individual parameters were over-evaluated as a criteria for vaccine formulation; today, we know that their principal value is to decide whether

el proceso de producción siguió un curso normal y, por lo tanto, si se puede esperar que el resultado sea similar al obtenido anteriormente.

the production process followed a normal course, and thus, if the result can be expected to be similar to those obtained previously.

b) Control de inactivación o de no infecciosidad del virus

Se realiza en tres diferentes etapas:

- Sobre la suspensión vírica monovalente inactivada: Se realiza sobre una muestra representativa de un total homogéneo de suspensión vírica inactivada, contenida en un recipiente único, sin "fondos de saco" y bajo agitación. El control consiste en inocular 10 ml de suspensión vírica en prueba en tres botellas roller de 2,0 litros de capacidad, con cultivos de células BHK₂₁ con 48 a 72 horas de cultivo. Si después de incubar durante 48 horas los cultivos presentan un aspecto normal, sin efecto citopatógeno alguno, las botellas se agitan enérgicamente y se toma 10 ml de líquido sobrenadante de cada una y se inocula un nuevo cultivo roller. Esta operación se repite nuevamente a las 48 horas. En esta forma se realizan tres controles paralelos, constando cada uno de tres pases en serie sobre células altamente susceptibles. Si al final de esos cultivos no se observó efecto citopático, se toman muestras del último pase y se realiza una prueba de FC que debe dar resultado negativo. Todo ese sistema de pruebas se repite por lo menos dos veces para cada suspensión vírica monovalente.

- La prueba se repite sobre la suspensión vírica trivalente, antes de formular la vacuna.

- La última muestra se extrae del producto final, tratando la vacuna con cloroformo o con triclorotrifluoretano (TTE) (9), con lo que se rompe la emulsión y se libera el antígeno que es sometido a un nuevo control de inactivación.

c) Controles de emulsión

Una vez que la suspensión vírica pasó por los controles de no infectividad, se procede a su emulsificación en la mezcla Marcol 52/Montanide 888, previamente controlada en cuanto a su toxicidad en ratones (Berlin, 23).

(b) Inactivation or non-infectivity controls

These controls are performed at three different stages:

- Monovalent inactivated viral suspension are tested for the absence of infectivity of the by collecting a representative sample of a continuously agitated, homogeneous inactivated virus suspension from one single vessel, without niches where the content is not moved. For the test, 30 ml of the inactivated viral suspension is collected and 10 ml is added to each of three 2-liter roller bottles with 48 to 72 hour-old BHK₂₁ cell cultures. If, after 48 hours of incubation, cytopathic effect is not observed in the cultures, each bottle is vigorously shaken and 10 ml of the fluid sub-inoculated into another culture bottle. This operation is repeated after 48 hours, resulting in three serial passages in parallel in highly susceptible cells. If no cytopathic effect is observed, a sample of the last subpassage is tested by CF, and this test must also give a negative result. This whole test system is repeated at least twice for each monovalent suspension.

- After the three monovalent suspensions are combined for a trivalent vaccine the whole test is repeated prior to further formulation of the vaccine.

- Finally, a last sample is recovered from the completed vaccine by breaking the oil emulsion with chloroform or with trichlorotrifluorethane (TTE) (9). Again the antigen suspension is similarly tested for non-infectivity.

(c) Emulsion controls

Once the inactivated viral suspension passes the non-infectivity control it is emulsified in the mixture of Marcol 52 and Montanide 888, which previously were tested in mice for toxicity, according to the test of Berlin (23).

La emulsión obtenida se somete a controles para confirmar su carácter de emulsión primaria agua en aceite, el grado de dispersión, estabilidad en pruebas severas de centrifugación y conservación a temperaturas de 4°, 37° y 56°C. Las emulsiones primarias totalmente controladas son la base cuando se desea formular una vacuna de doble emulsión cuya composición agua-aceite-agua le da características físicas totalmente diferentes.

d) Controles bacteriológicos

Tanto en el producto final, como en todas las etapas anteriores, se realizan estrictos controles bacteriológicos y solo se trabaja con materiales estériles. Cualquier contaminación bacteriana o por hongos es motivo de descarte del material.

En el Cuadro 10 se describen los controles realizados en las vacunas producidas por PANAFTOSA en 1989, totalizando 8410 pruebas.

El control del proceso de producción genera un rápido aumento de información que es difícil de manejar. PANAFTOSA desarrolló un programa computarizado para almacenar y organizar los datos y así disponer de la información fácilmente para su comparación y revisión.

The emulsion is also tested to show that it has the properties of a primary emulsion of the water-in-oil type and to determine the degree of dispersion. The stability of the emulsion is tested by centrifugation and by maintaining it at 4, 37 and 56 centrigades for a certain amount of time. If required, such totally controlled primary emulsions can be used to formulate double emulsion vaccines of the water-in-water type, which has totally different physical characteristics.

(d) Bacteriological controls

Both the final product and the products of all previous phases are tested microbiologically to insure that only sterile components are incorporated in the vaccine. Any material contaminated with bacteria or fungi is discarded.

Table 10 lists 8410 tests that were performed at PANAFTOSA in 1989 alone.

The control of the production process generates a vast amount of information, which is difficult to manage. A computer program was developed by PANAFTOSA to store, retrieve, and organize the data, in order to have the information readily accessible for review and comparison.

CUADRO 10. Control del proceso de producción de vacuna antiaftosa. 1989

TABLE 10. Control of production process of foot-and-mouth disease vaccine. 1989

	Medio Medium	Cultivo celular Cell culture	Antígeno Antigen	Mezcla antígeno Antigen mixture	Envase vacuna Vaccine vial	Total
pH	203	214x4	129x12	32		2639
Osmolaridad / Osmolarity	203	214	129			546
Microbiológico / Microbiological	203	214	129x2	32	12x2	731
Conteo de células / Cell count		214x4	129x9			2017
Título FC / CF titer			129x5	32	12	689
Subtipificación FC / CF subtyping			129	32	12	173
Título UFP / PFU titer			129x8			1032
No infecciosidad / Non-infectivity			129	32	12	173
Masa antigénica / Antigenic mass - µg/ml			129	32	12	173
Integridad VP1 / VP1 integrity			129			129
Resistencia eléctrica / Electric resistance					12x4	48
Centrifugación / Centrifugation					12x4	48
Estabilidad / Stability					12	12
	609	2140	5289	192	180	8410

Fuente / Source: J.A. Mesquita *et al.* (52).

El computador da un número de referencia para cada etapa o producto en el proceso de producción. Al entrelazar los números de referencia es posible obtener información sobre todos los pasos anteriores, incluyendo los materiales usados y los controles realizados en cada una de las etapas. Además permite determinar cuales vacunas contienen un determinado ingrediente, así como las que se encuentran dentro de ciertos parámetros (52).

4.2 Control del producto final

a) Consideraciones generales

Los métodos de control de la vacuna antiaftosa pueden ser clasificados como directos e indirectos.

Métodos directos: Los métodos directos son aquellos en que se vacuna la especie animal a la cual la vacuna se destina y después de cierto tiempo se realiza una descarga de virus y se verifica la protección, o no, de los animales vacunados.

El método original de la dosis protectora 50% (DP_{50}) fue descrito por Henderson y Galloway en 1952-53 en Inglaterra (45). Los autores utilizaron 32 bovinos susceptibles divididos en cuatro grupos de ocho animales. El primer grupo recibió una dosis normal de vacuna, los grupos segundo y tercero recibieron dosis decrecientes de vacuna, siguiendo una progresión geométrica y el cuarto grupo se dejó como testigo sin vacunar. Esta técnica fue denominada vacunación a volumen variable. A las tres semanas los bovinos vacunados y los controles fueron inoculados por vía IDL con 10^4 dosis infectante 50% (DI_{50}) y la protección medida como ausencia de lesiones podales.

La cantidad de vacuna que protege 50% de los bovinos vacunados contra la generalización es estimada usando algunos métodos estadísticos, tales como Reed & Muench, Spearman-Kärber o el método de Probits. La generalización parcial (1 ó 2 patas) no es tomada en cuenta ni la extensión de las lesiones a la mucosa oral.

Con la evolución en la preparación de las vacunas, la dosis vacunal disminuyó notablemente, siendo más difícil fraccionarla a fin de establecer la DP_{50} . Varios laboratorios estudiaron métodos

The computer assigns a reference number to each step or product in the production process. By linking the reference numbers it is possible to trace back all previous steps, including the materials used and the tests and controls done at each of these steps. It also let us determine which vaccines contain a certain ingredient and which vaccines are within certain parameters (52).

4.2 Control of the final product

(a) General considerations

FMD vaccine control methods can be either direct or indirect.

Direct methods are those in which animals of the species for which the vaccine is intended are vaccinated and after a certain period of time are exposed to the virus. The level of protection in the vaccinated animals is then assessed.

The original 50% protection dose (PD_{50}) method called the variable volume technique, was described by Henderson and Galloway in 1952-53 in England (45). A group of 32 susceptible cattle were divided in four groups of eight animals. One group was given the normal vaccine dose and the second and third group received geometrically decreasing doses. The fourth group served as a non-vaccinated control group. This technique was called the variable volume method. After three weeks all cattle were inoculated intradermolingually (IDL) with 10^4 infective doses 50% (ID_{50}). Animals that did not develop foot lesions were considered to be protected.

The quantity of vaccine which protects 50% of the vaccinated cattle against generalization is estimated using some statistical method such as Reed & Muench, Spearman-Kärker or probit approximation. Partial foot generalization (only 1 or 2 feet affected), nor extension of the oral lesions is taken into consideration.

As newer vaccine production methods evolved, the vaccine dose became substantially smaller making it rather difficult to establish a PD_{50} with the variable dose technique. Several laboratories developed other techniques, based on the same principle (30, 47, 48, 54, 59, 68) such as the 50% vaccine dose or the 50% potency

derivados (30, 47, 48, 54, 59, 68), tales como la dosis vacunal 50% o la potencia bovina 50% (34, 64, 68). En ese caso, las vacunas eran diluidas generalmente con un factor 4 y el volumen vacunal uniforme. La substancia tampón para dilución de la vacuna (tampón bicarbonato) era inmunológicamente inerte.

Para la DP_{50} , varios laboratorios usan diferentes intervalos de diluciones para diversas muestras de virus. El número de animales por prueba es siempre pequeño (5 a 8 por dilución), disminuyendo el valor estadístico del método.

Las estimativas para porcentajes de protección frente a la generalización después de la administración de un número dado de DP_{50} han sido hechas por numerosos autores (70). Con 10 DP_{50} se espera una protección sobre 95% a las 3-4 semanas, lo que también debe reflejarse en la duración de la inmunidad. Sin embargo, las informaciones en ese sentido son escasas y no se puede asegurar que vacunas (especialmente con adyuvante de HS) con DP_{50} elevadas produzcan protección por más de cuatro meses a la primovacuna.

El método de protección a la generalización podal 50% (PGP_{50}) (71), usado en Argentina y Brasil, consiste en la vacunación de un grupo de 16 bovinos con una vacuna sin diluir. Después de 3-4 semanas de la vacunación se realiza una descarga de virus con 10^4 DI_{50} por vía IDL en dos sitios en los bovinos vacunados, agregándose dos controles susceptibles. La lectura se hace a los siete días después de la inoculación y se consideran protegidos los animales que no presentan lesiones podales de generalización.

La farmacopea europea establece sobre la estimativa de la potencia de vacunas antiaftosa en bovinos: "que son animales no protegidos aquellos que presentan lesiones en otros locales diferentes de los puntos de inoculación." Por lo tanto, queda establecido que todos los métodos directos tienen característica "quantal" (sí o no), a veces dependiendo de una pequeña lesión en apenas una pata.

Mowat (53), trabajando con el método de DP_{50} en Inglaterra, observó que en algunas pruebas son encontrados animales con lesiones de fiebre aftosa en una sola pata y la subsecuente titulación del suero, obtenido antes de la descarga, revela que ellos tienen títulos de anticuerpos circulantes simi-

cattle dose (34, 64, 68). Generally, the vaccines were diluted 4-fold and used in uniform volume. The diluent buffer solution (bicarbonate buffer) was immunologically inert.

Various laboratories used different dilution intervals for different viruses for the PD_{50} method. The number of animals per dilution always is small (5-8 per dilution), which decreased the statistical value of the results.

Various authors (70) have tried to estimate the percentage of protection as measured by generalization following challenge of vaccinated with various amounts of antigen. In general it is assumed that 3-4 weeks following the vaccination with 10 PD_{50} a population protection of >95% can be expected. This high degree of protection should also be reflected in the duration of immunity. However, the information is scarce and one can not be sure (particularly with SH vaccines) that an elevated PD_{50} also will provide protection beyond four months after a first vaccination.

The 50% protection against foot generalization (PGP_{50}) method (71) is used in Argentina and Brazil and consists of the vaccination of 16 cattle with undiluted vaccine. After 3-4 weeks the vaccinated animals, together with a group of control animals, are inoculated IDL at two sites with 10^4 ID_{50} . Animals that do not have foot lesions seven days after the virus exposure are considered to be protected.

The European Pharmacopea refers to the estimation of the potency of FMD vaccines in cattle as follows: "Non-protected are those animals that present lesions in other places than at the inoculation sites". Thus, all direct methods have a "quantal" (yes or no) response, and the outcome of the test could depend—as quite often happens—on a small lesion on one foot only.

Mowat (53) working with the PD_{50} method in England, rather frequently observed that animals with one foot lesion had equally high circulating antibody titers at time of challenge than others that were fully protected. He reported that 75% of vaccines tested against type O had results with one or more cattle in this category, while 50% of the tests with virus types A and C had the same results.

lares a los de otros animales protegidos. La ocurrencia de esas observaciones no es rara, siendo que 75% de las vacunas examinadas frente al virus O presentaron resultados con uno o más bovinos en esa categoría. Para los virus A y C, el porcentaje estuvo en alrededor de 50% de las pruebas, en las cuales ocurrió lo mismo.

Una explicación para el fenómeno es que la lesión desarrollada en una sola pata, después de la inoculación por vía IDL, no se debe a viremia, sino que es el resultado de una infección local provocada por la gran cantidad de virus en el ambiente. Las observaciones y la interpretación dadas por Mowat son confirmadas por el hecho de que todos los bovinos con lesión en una pata, en las pruebas citadas, presentaron elevados títulos de anticuerpos.

Los principales problemas relacionados con el uso de animales grandes para las pruebas de rutina de control de vacuna antiaftosa son:

- el pequeño número de animales usados en cada prueba, lo que disminuye la validez estadística de los resultados;
- problemas con la interpretación de lesiones locales en una o dos patas, a pesar del alto nivel de anticuerpos;
- elevado costo de las pruebas en bovinos, los que deben ser sacrificados y sus despojos esterilizados;
- necesidad de disponer de instalaciones con dispositivos de bioseguridad y salvaguardia ambiental eficientes que son de altísimo costo en su construcción y operación;
- riesgos de escapes de virus al medio ambiente, cuando no se dispone de un "biocontainment" apropiado y eficiente.

Métodos indirectos: En las pruebas indirectas se estudian los anticuerpos circulantes producidos por la vacuna en la especie a la cual se destina. Las principales pruebas utilizadas para la detección de anticuerpos son la seroneutralización y la seroprotección.

Van Bekkum (70) considera que la evaluación de la respuesta de anticuerpos tiene ventajas evidentes. Se evitan pruebas con virus virulento en bovinos, lo que reduce el costo de la operación y los riesgos involucrados, y como desventaja el hecho de que solo se estaría considerando la

A lesion on one foot would more likely be caused by local infection, as a consequence of the large amount of virus in the environment, than by viremia. This assumption is supported by the fact that most of such animals have high circulating antibody levels which would make viremia unlikely.

The principle problems related to the use of large animals in routine FMD potency tests are:

- the small number of animals used decreases the statistical validity of the test results;
- difficulties with the interpretation of local lesions on one or two feet, in spite of high antibody levels;
- high costs of tests in cattle, which must be slaughtered and the carcasses disposed of in a sanitary manner;
- need for biological containment installations insuring efficient environmental safeguards, which are very costly both in construction and maintenance;
- risk of virus escape in the environment when such appropriate and efficient biocontainment facilities are not being used.

Indirect methods are those in which circulating antibodies are assayed in the species for which the vaccine is intended. The principle assay methods for the detection of antibodies are serum neutralization and mouse protection tests.

Van Bekkum (70) pointed out the advantages of antibody assays. The use of virulent virus in cattle is avoided, which reduces operation costs and the risks of spreading the virus, but, a disadvantage that only the humoral immune response is measured. However, it must be mentioned that neutralizing antibodies appear to be the principle defense against FMD virus.

respuesta humoral. Sin embargo, se debe mencionar que los anticuerpos neutralizantes son considerados como el principal factor de protección en infecciones causadas por el virus de la fiebre aftosa.

Stellmann y col., 1968 (63) consideran que el uso de métodos cuantitativos (pruebas serológicas) para el establecimiento de la respuesta inmunitaria, tomados individualmente, podría aumentar mucho la precisión de las pruebas, en lugar del método quantal (si o no) de descarga.

Amadori y col. (10) encontraron buena correlación entre los niveles de anticuerpos neutralizantes, en pruebas de potencia de vacuna en Italia, en los bovinos vacunados e inoculados con virus virulento. Esta correlación fue más evidente frente a los virus O y A.

Ahl y Wittmann (4), usando la técnica de neutralización por reducción de placas, analizaron y compararon los resultados de protección de bovinos por descarga directa. Los resultados se refieren a 30 series de vacunas. Los valores de los títulos de neutralización estuvieron correlacionados con los resultados de la descarga en los bovinos.

Fédida y col., 1977 (32), al analizar las pruebas de evaluación de anticuerpos, tanto en ratones como en cultivos celulares, concluyeron que eran más confiables, sensibles, reproducibles y económicas, pudiendo ser comparadas con la protección de bovinos cuando inoculados por vía IDL.

Desde 1957, PANAFTOSA está trabajando con la técnica del índice de seroprotección (ISP) en ratones lactantes. En un trabajo preliminar, Cunha y col. (28) establecieron valores del ISP y su significación inmunológica en bovinos vacunados contra la fiebre aftosa y también en bovinos controles. Esos ISP eran comparados a la protección de los bovinos inoculados por vía IDL, considerando las lesiones de generalización podal. Los índices señalados por Cunha y col. (28) fueron, en gran parte, comprobados en todos los trabajos experimentales con vacunas, no solo en PANAFTOSA sino también en casi todos los países de América del Sur, donde el método tuvo gran divulgación. A pesar de eso, los resultados encontrados produjeron algunas restricciones pues carecían de un análisis estadístico correspondiente.

Stellmann *et al.* in 1968 (63) discussed the use of quantitative serological tests to establish the immune response. Such tests should have greater precision than quantal tests (virus challenge with a yes or no response).

In Italy, Amadori *et al.* (10) found a good correlation between neutralizing antibody levels and protection in vaccine potency tests in cattle. This correlation was most evident for types O and A.

Ahl and Wittmann (4), compared the results of a plaque reduction neutralization test with the protection of cattle following virus challenge in potency tests of 30 batches of vaccine. The plaque reduction neutralization titers correlated well with the challenge results.

Fédida *et al.*, 1977 (32) evaluated antibody assay results, both in mice and in cell cultures, and concluded that the antibody assay was more reliable, sensitive, reproducible, and economical than inoculating vaccinated cattle by the IDL route.

Since 1957, PANAFTOSA has been working with the mouse protection index (MPI) in suckling mice as developed by Cunha *et al.* (28). These authors determined values for the MPI and their immunological significance in vaccinated and non-vaccinated cattle. The MPI values were compared with the protection of IDL challenged vaccinated cattle, considering foot lesions as a sign of generalization or non-protection. The significance of the MPI values were in large part confirmed in all experimental vaccine work, not only at PANAFTOSA but also in nearly all countries of the South American continent where the method was used extensively. However, the results had certain limitations because no statistical evaluation had been made.

Después de algunas modificaciones en las pruebas (aumento del número de ratones por dilución, padronización del antígeno de prueba sin usar virus adaptado a ratón), en 1975, Gomes y Astudillo (40) retomaron el tema. Esos autores realizaron un estudio estadístico sobre los ISP de 701 bovinos vacunados y 161 sin vacunar, sometidos a descarga de virus por vía IDL en relación con las lesiones de generalización podal. La prueba demostró porcentajes de 77% de sensibilidad y 85% de especificidad con relación a los verdaderos y falsos protegidos. En ese mismo trabajo, los autores sugirieron para cada valor de ISP de bovinos vacunados una EPP (Cuadro 11).

Esas expectativas, basadas en los datos comparativos de los ISP con los resultados de la descarga de virus en bovinos a los 21 DPV, significan la probabilidad de que el animal está protegido con determinado índice. Los resultados de este trabajo fueron confirmados por diversas pruebas realizadas en PANAFTOSA con centenas de bovinos.

La precisión de la prueba del ISP fue estudiada por Astudillo y col. (12) quienes establecieron los límites de la variación tolerable, repitiendo determinaciones de un mismo suero en condiciones ciegas. Se encontró un alto nivel de semejanza ($P < 0.01$) y una desviación estándar de 0.24.

In later years workers at PANAFTOSA introduced some modifications to the test such as increasing the number of mice per dilution, standardizing the virus in the test, and the use of non-mouse adapted virus. In 1975, Gomes and Astudillo (40) made a new statistical study of the MPI test and analyzed the MPI of 701 vaccinated and 161 non-vaccinated cattle, which were IDL inoculated and classified as being protected or not on the basis of the appearance of foot lesions. According to this study, the test had a sensitivity of 77% and a specificity of 85%. In the same paper the authors suggest an expected percentage of protection (EPP) for each MPI value of vaccinated cattle (Table 11).

The EPP, established by comparative results of the MPI and the challenge of cattle at 21 DPV, indicates the probability that an animal will be protected according to its MPI. The results of this work were confirmed in several PANAFTOSA experiments involving hundred of cattle.

The precision of the MPI test was studied by Astudillo *et al.* (12) who established the variation of the test. They found a high degree of reproducibility ($P < 0.01$) when testing the same sera repeatedly and a standard deviation of 0.24.

CUADRO 11. Índice de seroprotección (ISP) en sueros de bovinos y expectativas porcentuales de protección (EPP)

TABLE 11. Mouse protection index (MPI) of cattle sera and expected percentage of protection (EPP)

ISP/MPI	EPP	ISP/MPI	EPP	ISP/MPI	EPP	ISP/MPI	EPP
0.0	20	1.0	51	2.0	81	3.0	96
0.1	23	1.1	55	2.1	84	3.1	97
0.2	25	1.2	58	2.2	86	3.2	97
0.3	28	1.3	61	2.3	87	3.3	98
0.4	31	1.4	65	2.4	89	3.4	98
0.5	34	1.5	68	2.5	91	3.5	98
0.6	38	1.6	71	2.6	92	3.6	99
0.7	41	1.7	74	2.7	93	3.7	99
0.8	44	1.8	76	2.8	94	3.8	99
0.9	48	1.9	79	2.9	95	3.9	99

Fuente/Source: Gomes & Astudillo (40).

Sutmoller y col. (67) en PANAFTOSA, al analizar pruebas de seroneutralización por microtécnica (33), establecieron las EPPs (Cuadro 12).

Actualmente, PANAFTOSA usa como mínimo 12-16 bovinos para controlar la vacuna. A los 30 DPV se recolectan sueros y la media de las EPP es calculada de los ISP individuales o de los títulos de seroneutralización. La potencia de las vacunas es así expresada como el límite inferior de confianza (-0.95) de la media de las EPP del grupo (66).

Debido a la gran experiencia adquirida durante el correr de los años, la prueba de seroprotección ha sido la preferida por PANAFTOSA para el control de vacunas, en vez de la prueba de seroneutralización. A ese respecto, Cowan (27) señala que aunque en la seroprotección (el suero es usado puro) falten las características de la prueba cuantitativa de seroneutralización, los resultados son más confiables con relación a la inmunidad de los animales, con el propósito de evaluar las vacunas y determinar la inmunidad de la población.

Con el fin de disponer de bovinos para las pruebas de potencia, a un costo razonable, el Centro seleccionó algunas propiedades que presentan características particulares, tales como: a) condiciones de aislamiento; b) no ocurrencia de fiebre

Sutmoller *et al.* (67) at PANAFTOSA analyzed the results of microtiter serum neutralization tests (33) and established EPP values for that system (Table 12).

Presently, PANAFTOSA uses at least 12-16 cattle to test each vaccine. Thirty DPV, sera are collected and a mean EPP is calculated from the individual MPI or from the neutralization titers. The potency of the vaccine is then expressed as the lower confidence limit (-0.95) of the mean EPP of that group (66).

Over the years, PANAFTOSA has obtained a vast experience with the MPI test and, therefore, this test is preferred over the neutralization test for the control of vaccines. Cowan (27) has indicated that although the mouse protection test (with undiluted serum) lacks the characteristics of a quantitative serum neutralization test, the MPI test is more reliable in relation to estimating the immunity of the animal for the evaluation of vaccines or the approximation of population immunity.

In order to have sufficient cattle available for vaccine potency tests, at a reasonable cost, PANAFTOSA worked out a system with a number of farms, which must fulfill the following conditions: (a) being situated in an isolated site;

CUADRO 12. Prueba de neutralización.
Expectativa porcentual de protección (EPP)

TABLE 12. Mouse protection test.
Expected percentage of protection (EPP)

TN	EPP %	TN	EPP %	TN	EPP %	TN	EPP %
0.1	08	1.1	30	2.1	71	3.1	92
0.2	09	1.2	34	2.2	74	3.2	93
0.3	10	1.3	38	2.3	77	3.3	94
0.4	11	1.4	42	2.4	80	3.4	95
0.5	13	1.5	46	2.5	82	3.5	95
0.6	15	1.6	50	2.6	84	3.6	96
0.7	17	1.7	56	2.7	86	3.7	96
0.8	19	1.8	60	2.8	88	3.8	98
0.9	22	1.9	64	2.9	90	3.9	99
1.0	26	2.0	68	3.0	91	4.0	99

TN = Título de neutralización. / Neutralization titre.

Fuente / Source: Sutmoller *et al.* (66).

aftosa en los últimos cinco años; c) carreteras y aguadas propias; d) ingreso de un número mínimo de animales y de forma controlada; e) propiedad destinada al ganado de carne; f) registros de nacimiento controlados; g) mínimo de 80 terneros nacidos por mes; h) infraestructura para trabajos de marcación, sangrías, vacunaciones, etc.

Los terneros son identificados con tatuaje y caravanas en la oreja, a los 30 días de nacidos, y son mantenidos sin vacunar en la propiedad hasta los 9-10 meses de edad, cuando son vacunados con las vacunas a controlar. Antes de la vacunación, los animales son sangrados y los sueros sometidos a pruebas de seroneutralización frente a los serotipos O, A y C y anticuerpos anti-VIA por las pruebas de inmunodifusión en gel de agar (IDGA) (57) o ELISA (6). Los bovinos adultos de la propiedad son vacunados sistemáticamente a cada 6 ó 12 meses con vacunas de adyuvante oleoso producidas por PANAFTOSA. Con ese sistema, mantenido por más de 10 años, el Centro utiliza en sus pruebas de control terneros homogéneos en raza, peso, edad, estados de nutrición y sanitario adecuados, lo que proporciona confianza y reproducibilidad de los resultados.

En el período de 1985-90, en esas propiedades para el control de vacunas fueron utilizados 5987 bovinos, de los cuales se extrajeron sueros para 20.310 pruebas de protección frente a los virus de los serotipos O, A y C.

b) Control de vacunas realizado por PANAFTOSA y LARA, Campinas

A pesar de que PANAFTOSA ya dominaba ampliamente la técnica del ISP y conocía su correspondencia con las pruebas de descarga directa de virus, durante toda la etapa experimental y desarrollo de la vacuna con adyuvante oleoso, las vacunas fueron probadas por los dos métodos en bovinos, ISP y por descarga directa de virus por vía IDL. También en este período se puso a punto una técnica de prueba de potencia de vacuna en cobayos (9, 35), usando como diluyente activo una emulsión de medio de cultivo en adyuvante oleoso; esa emulsión fue similar a la vacuna pero sin virus.

(b) absence of FMD for at least five years; (c) own roads and water supply; (d) a minimum of animals entering the farm and under controlled conditions; (e) raise meat cattle; (f) controlled birth registration; (g) a minimum of 80 calves born per month; (h) an infrastructure for the marking, bleeding, vaccinations, etc.

On these farms the calves are identified by a tattoo and ear tags at 30 days of age and are maintained on the farm until the age of 9-10 months, at which time they are vaccinated with the vaccine to be potency tested. Before the vaccination the animals are bled. The serum is tested by serum neutralization against serotypes O, A and C and for VIA antibodies in agar gel immunodiffusion (AGID) (57) or ELISA (6). The adult cattle at the farm are systematically vaccinated every 6 or 12 months with oil-adjuvanted vaccine produced at PANAFTOSA. This system has been in effect now for more than 10 years, providing PANAFTOSA with uniform young cattle which are homogeneous with regard to breed, weight, age, nutritional and health condition. Potency tests of the oil-adjuvanted vaccines performed with such cattle provide confidence and reproducibility of the results.

During the period of 1985-90 using this system of FMD vaccine potency testing, PANAFTOSA used 5987 cattle and performed 20,310 MPI tests against virus types O, A and C.

(b) Vaccine control for PANAFTOSA and LARA, Campinas

During the experimental and development phase of the oil-adjuvanted vaccine all vaccines were potency tested by the MPI method and by the traditional direct challenge method in cattle. The latter method was included for comparison of the results, even though PANAFTOSA relied completely on the MPI technique for quality control and potency testing. During this period the vaccine potency test in guinea pigs (9, 35) was also introduced, diluting the vaccine in an active diluent consisting of cell culture medium in oil adjuvant, or in other words, an emulsion similar to the vaccine but without antigen.

Las pruebas en bovinos fueron realizadas en Argentina, Brasil y Uruguay. Nos referiremos a algunas de ellas en donde, al estudiar aspectos como la dilución de la vacuna con diluyente activo para establecer su potencia o estudiando otros aspectos como la duración de la inmunidad o la autoconservación de la vacuna en cámara fría, se puede apreciar la correlación entre índices de anticuerpos y protección frente a la descarga directa de virus.

El Cuadro 13 muestra la protección de bovinos inoculados por vía IDL con 10^4 DI_{50} de la cepa de virus de la fiebre aftosa O₁ Campos, después de vacunados con diferentes diluciones de vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso y a diferentes DPV.

Se puede ver que mismo una dilución tan elevada como 1:64 protegió un considerable porcentaje de los animales por un período de tres meses.

Los Cuadros 14 y 15 muestran la respuesta inmunitaria individual de bovinos vacunados con vacuna con adyuvante oleoso inoculados por vía IDL con el virus de la fiebre aftosa O₁ Campos, a los 97 y 186 DPV, respectivamente.

Direct oil-adjuvanted vaccine potency tests were done in Argentina, Brazil and Uruguay. We will refer to some of those tests in relation to studies of the following aspects: dilution of vaccine with active diluent to develop the potency test techniques; duration of immunity; cold storage of oil-adjuvanted vaccine. The results once again will illustrate the correlation between antibody test results and the results of direct virus challenge.

Table 13 lists the results of a cattle experiment in which the animals were vaccinated with different dilutions of oil-adjuvanted vaccine and challenged at different periods after vaccination. The challenge virus was 10^4 ID_{50} type O₁ Campos FMD virus inoculated by the IDL route.

Even at a high dilution such as 1:64 a considerable portion of the cattle were protected for a period of as long as three months.

Tables 14 and 15 show the individual response of the same vaccinated cattle at 97 and 186 DPV, respectively.

CUADRO 13. Protección de bovinos inoculados por vía IDL con 10^4 DI_{50} de la cepa de virus de la fiebre aftosa O₁ Campos, después de vacunados con diferentes diluciones de vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso y a diferentes días posvacunación

TABLE 13. Protection of cattle inoculated intradermolingually with 10^4 ID_{50} of O₁ Campos FMD virus after vaccination with different dilutions of oil-adjuvanted FMD vaccine at different postvaccination days

Dilución de la vacuna Dilution of vaccine	Días posvacunación/Days postvaccination			
	35	97	186	Total
1:1	5/5	5/5	5/5	15/15
1:4	5/5	5/5	5/5	15/15
1:16	5/5	5/5	3/5	13/15
1:64	3/5	4/5	2/4	9/14
1:256	3/5	3/5	1/5	7/15

Fuente / Source: Abaracón, D. *et al.* (1).

CUADRO 14. Respuesta inmunitaria de bovinos vacunados con vacuna de adyuvante oleoso inoculados por vía IDL con el virus de la fiebre aftosa O₁ Campos, 97 días después de la vacunación

Dilución de la vacuna	Nº de bovinos	ISP ^a	MT ^b	Lesiones
1:1	001	>4,50	≥3,45	Neg.
	002	2,90	2,70	L ^c
	003	>4,50	3,15	L
	004	>4,50	3,30	L
	005	>4,50	3,15	Neg.
1:4	006	>4,50	3,30	Neg.
	007	>4,50	≥3,60	Neg.
	008	>4,50	≥3,45	Neg.
	009	>4,50	≥3,45	Neg.
	010	4,50	≥3,45	L
1:16	011	>4,50	3,15	Neg.
	012	2,75	3,00	L
	013	2,75	3,15	L
	014	>4,50	≥3,60	L
	015	—	3,15	L
1:64	016	0,00	1,50	L 4P ^d
	017	2,11	2,70	L
	018	3,85	≥3,60	L
	019	≥3,60	≥3,60	L
	020	1,60	2,70	L
1:256	021	4,00	3,00	L
	022	0,35	≤1,20	L 4P
	023	0,35	1,95	L
	024	1,60	2,70	L
	025	0,85	1,80	L 4P
Controles	25	0,35	≤0,60	L 4P
	30	0,20	≤0,60	L 4P

^aISP = índice de seroprotección.

^bMT = neutralización por microtécnica.

^cL = lesiones en el punto de inoculación de la lengua.

^dP = número de patas con lesiones.

Fuente: Abaracón, D. *et al.* (1).

TABLE 14. Immune response of cattle vaccinated with oil-adjuvanted vaccine and exposed by IDL inoculation with foot-and-mouth disease virus O₁ Campos 97 days postvaccination

Vaccine dilution	No. of cattle	MPI ^a	MNT ^b	Lesions
1:1	001	>4.50	≥3.45	Neg.
	002	2.90	2.70	T ^c
	003	>4.50	3.15	T
	004	>4.50	3.30	T
	005	>4.50	3.15	Neg.
1:4	006	>4.50	3.30	Neg.
	007	>4.50	≥3.60	Neg.
	008	>4.50	≥3.45	Neg.
	009	>4.50	≥3.45	Neg.
	010	4.50	≥3.45	T
1:16	011	>4.50	3.15	Neg.
	012	2.75	3.00	T
	013	2.75	3.15	T
	014	>4.50	≥3.60	T
	015	—	3.15	T
1:64	016	0.00	1.50	T 4F ^d
	017	2.11	2.70	T
	018	3.85	≥3.60	T
	019	≥3.60	≥3.60	T
	020	1.60	2.70	T
1:256	021	4.00	3.00	T
	022	0.35	≤1.20	T 4F
	023	0.35	1.95	T
	024	1.60	2.70	T
	025	0.85	1.80	T 4F
Controls	25	0.35	≤0.60	T 4F
	30	0.20	≤0.60	T 4F

^aMPI = mouse protection index.

^bMNT = microneutralization test.

^cT = tongue lesion at inoculation site.

^dF = number of feet affected.

Source: Abaracón, D. *et al.* (1).

CUADRO 15. Respuesta inmunitaria de bovinos vacunados con vacuna de adyuvante oleoso inoculados por vía IDL con el virus de la fiebre aftosa O₁ Campos, 186 días después de la vacunación

Dilución de la vacuna	Nº de bovinos	ISP	MT	Lesiones
1:1	102	3,70	3,15	L
	103	1,90	2,85	L
	104	1,50	2,85	L
	105	3,01	≥3,60	L
1:4	106	2,75	3,30	L
	107	2,00	3,30	L
	108	≤1,00	2,10	L
	109	2,75	≥3,60	L
	110	3,90	3,15	L
1:16	111	2,08	3,15	L
	112	2,68	3,30	L
	115	0,68	2,40	L 2P
	116	1,43	≥3,60	L
1:64	117	1,68	2,85	L
	118	1,18	2,40	L 4P
	119	0,43	1,65	L 4P
	120	2,08	2,55	L
1:256	121	0,93	1,65	L 3P
	122	2,43	2,85	L
	123	0,68	≤1,35	L 4P
	124	≤0,18	≤1,20	L 4P
	125	0,93	1,80	L 4P
Controles	140	0,25	≤1,20	L 4P
	142	0,25	≤1,20	L 4P
	143	0,25	≤1,20	L 4P

Fuente: Abaracón, D. *et al.* (1).

Se observó que los valores de seroprotección y neutralización por microtécnica $\geq 2,5$ correspondían a animales protegidos. Sin embargo, valores más bajos no indican necesariamente falta de protección. Una dosis respuesta gradual puede ser observada en los resultados de la inoculación y del nivel de anticuerpos.

TABLE 15. Immune response of cattle vaccinated with oil-adjuvanted vaccine and exposed by IDL inoculation with foot-and-mouth disease virus O₁ Campos, 186 days postvaccination

Vaccine dilution	No. of cattle	MPI	MNT	Lesions
1:1	102	3.70	3.15	T
	103	1.90	2.85	T
	104	1.50	2.85	T
	105	3.01	≥3.60	T
1:4	106	2.75	3.30	T
	107	2.00	3.30	T
	108	≤1.00	2.10	T
	109	2.75	≥3.60	T
	110	3.90	3.15	T
1:16	111	2.08	3.15	T
	112	2.68	3.30	T
	115	0.68	2.40	T 2F
	116	1.43	≥3.60	T
1:64	117	1.68	2.85	T
	118	1.18	2.40	T 4F
	119	0.43	1.65	T 4F
	120	2.08	2.55	T
1:256	121	0.93	1.65	T 3F
	122	2.43	2.85	T
	123	0.68	≤1.35	T 4F
	124	≤0.18	≤1.20	T 4F
	125	0.93	1.80	T 4F
Controls	140	0.25	≤1.20	T 4F
	142	0.25	≤1.20	T 4F
	143	0.25	≤1.20	T 4F

Source: Abaracón, D. *et al.* (1).

Protected cattle have MPI values ≥ 2.5 , but lower values do not necessarily mean lack of protection. A gradual dose-response can be observed with the challenge results as well as with the antibody levels.

También se puede observar una buena correlación, animal por animal, entre la protección conferida por diluciones crecientes de vacuna a diferentes plazos posvacunación, y los correspondientes índices de anticuerpos a los 97 y 186 DPV.

En el siguiente experimento se probaron vacunas oleosas y de HS, elaboradas con la misma suspensión vírica trivalente. Cada dosis de vacuna oleosa corresponde a 2,5 ml de suspensión vírica y cada dosis de vacuna HS corresponde a 7,0 ml de suspensión vírica (Cuadros 16 y 17).

Se puede observar que ambas vacunas protegieron un elevado porcentaje de bovinos después de almacenadas por un espacio prolongado de tiempo a 4°C. Todos los grupos que mostraron buenas medias de EPP fueron también bien protegidos frente a la descarga directa de virus.

En el área demostrativa de campo realizada en Valença, Rio de Janeiro, Brasil (58), sobre 46.000 bovinos, se controló la inmunidad de la población por muestras sometidas a pruebas de seroneutralización. Los valores indicaron un buen nivel de protección, pero para hacer otro ensayo comparativo se tomó un grupo de 30 bovinos adultos que habían sido vacunados tres veces, a intervalos de

Also a good correlation existed between the protection at increasing dilutions at different intervals postvaccination and the corresponding antibody values at 97 and 186 DPV.

In the next experiment SH vaccine and oil-adjuvanted vaccine were stored at 4°C and tested in cattle at different intervals. Because of the difference in the production process, the oil-adjuvanted vaccine contained 2.5 ml of antigen suspension and the SH vaccine the equivalent of 7 ml of the same antigen suspension (Tables 16 and 17).

Both vaccines protected a high percentage of the cattle after a prolonged storage period at 4°C as demonstrated by direct challenge and the mean EPP.

A serological population immunity survey, covering 46,000 cattle, was made in the field demonstration area of Valença, Rio de Janeiro, Brazil (58). The values obtained indicated a solid protection. Additional information was obtained by the challenge of 30 adult cattle that were vaccinated with oil-adjuvanted vaccine three times at six-month intervals. At the time of the challenge test the last vaccination had been done 13 months previously. These cattle and four unvaccinated

CUADRO 16. Protección de bovinos vacunados con vacunas contra la fiebre aftosa almacenadas durante 1 a 15 meses

Vacuna	Cepas de desafío	Meses de almacenamiento de las vacunas a + 4°C			
		1	8	13	15
Con adyuvante oleoso	O ₁	9/9 ^a	—	—	12/12
	A ₂₄	8/8	12/12	12/12	—
	C ₃	8/8	—	—	12/12
Con hidróxido de aluminio-saponina	O ₁	8/8	—	—	—
	A ₂₄	8/8	12/12	11/12	—
	C ₃	8/8	—	—	—

^a Número de animales protegidos/Número total de animales.

Fuente: Abaracón, D. et al. (2).

TABLE 16. Protection of cattle vaccinated with foot-and-mouth disease vaccines stored for 1 to 15 months

Vaccine	Challenge strains	Months of storage of vaccine at 4°C			
		1	8	13	15
Oil adjuvant	O ₁	9/9 ^a	—	—	12/12
	A ₂₄	8/8	12/12	12/12	—
	C ₃	8/8	—	—	12/12
Aluminum-hydroxide-saponin adjuvanted	O ₁	8/8	—	—	—
	A ₂₄	8/8	12/12	11/12	—
	C ₃	8/8	—	—	—

^a Number of cattle protected/Total number.

Source: Abaracón, D. et al. (2).

CUADRO 17. Media de la expectativa porcentual de protección de bovinos después de la vacunación con vacunas antiaftosa almacenadas durante 1 a 15 meses

TABLE 17. Mean expected percentage of protection indices of cattle after vaccination with foot-and-mouth disease vaccines stored for 1 to 15 months

Vacuna Vaccine	Tipo de virus FMD virus	Meses de almacenamiento a +4°C Months of storage at +4°C			
		1	8	13	15
Con adyuvante oleoso Oil adjuvant	O ₁	97 ± 5	98 ± 3	94 ± 10	98 ± 1
	A ₂₄	96 ± 7	98 ± 2	88 ± 17	...
	C ₃	99	97 ± 5	80 ± 20	95 ± 5
Con hidróxido de aluminio-saponina Aluminum-hydroxide saponin adjuvant	O ₁	93 ± 12	96 ± 3	78 ± 29	
	A ₂₄	92 ± 14	98 ± 3	93 ± 8	
	C ₃	98 ± 3	91 ± 4	81 ± 20	

... No hecho / Not done.

Fuente / Source: Abaracón, D. *et al.* (2).

seis meses, con vacuna de adyuvante oleoso y en el momento de la prueba hacía 13 meses que no recibían vacuna. Todos los bovinos del grupo vacunados, más cuatro bovinos sin vacunar, fueron inoculados por vía IDL con una dosis de 10.000 DI₅₀ de virus O₁ Campos. También fueron colocados juntos seis cerdos susceptibles que no fueron inoculados. Todos los animales quedaron en un mismo ambiente en íntimo contacto durante siete días. Los cuatro bovinos sin vacunar y los seis cerdos tuvieron aftosa generalizada, y un bovino y dos cerdos murieron. De los 30 bovinos vacunados, solo uno tuvo lesiones de generalización, coincidiendo con el más bajo índice de anticuerpos (42) (Cuadro 18).

En base a la información acumulada por el Centro sobre la correlación de valores entre los índices de anticuerpos y la PGP, PANAFOTSA controla todas las valencias de todas las series de vacunas por pruebas de potencia en cobayos (9) y por EPP en bovinos, expresada como límite inferior de confianza.

controls were inoculated IDL with 10,000 ID₅₀ of virus type O₁ Campos. Also, six susceptible pigs non-inoculated were added. All animals remained in the same quarters in close contact for seven days. The four control cattle and the pigs developed generalized FMD. One of the control cattle died as did two of the pigs. Only one of the vaccinated cattle developed generalized lesions, and this animal had the lowest level of antibody of any of the cattle in the group (42) (Table 18).

Based on the vast amount of information accumulated by PANAFOTSA on the correlation between antibody indices and the protection against generalization, the potency of all series produced was expressed as the lower confidence limit of the mean EPP in cattle.

CUADRO 18. Respuesta de bovinos expuestos al virus O₁ Campos de la fiebre aftosa, 13 meses después de la tercera vacunación con vacuna de adyuvante oleoso

TABLE 18. Response of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus O₁ Campos, 13 months after third vaccination with oil adjuvant vaccine

Bov. Cattle No.	Antes desafío/Before challenge					Desafío Lesiones	Challenge Lesions
	Microneutralización Microneutralization				ISP MPI		
	C Ind.	A Bagé	A Venc.	O ₁	O ₁		
651	≥3.2	3.2	≥3.5	≥3.6	3.7	Neg. ^a	Neg. ^a
652	≥3.6	≥3.5	2.9	3.3	2.2	L ^b	T ^b
653	≥3.6	≥3.5	3.3	3.2	4.9	Neg.	Neg.
654	≥3.6	≥3.5	≥3.6	≥3.6	>4.5	Neg.	Neg.
655	3.3	≥3.6	3.0	≥3.5	2.1	Neg.	Neg.
656	≥3.6	≥3.6	3.2	≥3.5	4.8	Neg.	Neg.
657	≥3.5	3.2	3.2	2.7	4.8	Neg.	Neg.
658	3.3	≥3.5	2.7	3.2	2.8	L	T
659	≥3.6	3.3	3.2	≥3.5	3.0	Neg.	Neg.
660	≥3.6	2.9	2.9	3.3	>4.5	Neg.	Neg.
661	≥3.5	≥3.6	3.0	3.3	2.5	L	T
662	≥3.6	≥3.6	≥3.5	≥3.6	4.0	Neg.	Neg.
663	≥3.6	≥3.6	≥3.6	≥3.6	>4.5	Neg.	Neg.
664	≥3.6	≥3.6	≥3.5	≥3.6	>4.5	Neg.	Neg.
665	≥3.5	3.3	≥3.5	2.9	2.0	Neg.	Neg.
666	≥3.6	≥3.6	≥3.6	≥3.6	4.7	Neg.	Neg.
667	2.7	2.7	2.3	2.6	1.0	L4P ^c	T4F ^c
668	≥3.6	≥3.6	2.9	≥3.5	>4.3	Neg.	Neg.
669	≥3.6	≥3.5	2.9	≥3.5	>4.3	Neg.	Neg.
670	≥3.6	≥3.5	≥3.6	≥3.5	>4.3	Neg.	Neg.
671	3.3	2.9	3.2	3.0	3.3	Neg.	Neg.
672	≥3.6	≥3.5	≥3.6	3.3	>4.3	Neg.	Neg.
673	≥3.6	≥3.5	3.0	3.3	3.6	Neg.	Neg.
674	≥3.5	≥3.5	2.7	3.3	2.7	L	T
675	≥3.6	≥3.5	3.0	≥3.5	4.7	Neg.	Neg.
676	3.3	2.9	2.4	2.6	1.5	L	T
677	≥3.6	3.3	2.4	3.0	1.5	L	T
678	≥3.6	3.3	≥3.5	≥3.6	>4.3	Neg.	Neg.
679	3.3	≥3.6	3.3	3.2	3.0	Neg.	Neg.
680	≥3.5	≥3.5	≥3.5	3.3	1.9	Neg.	Neg.

^aNegativos lengua y patas. / Negative for tongue and feet.

^bL = Lengua. / T = Tongue.

^cP = Patas. / F = Feet.

Fuente / Source: Gomes, I. et al. (42).

Para evaluar los resultados obtenidos con vacunas de su producción en escala semi-industrial, PANAFTOSA envió para el control oficial del Ministerio de Agricultura y Reforma Agraria de Brasil, dos series de vacunas que presentaban EPP correlacionadas con aprobación. La vacuna oleosa serie 333 trivalente fue examinada por descarga directa frente a los virus O_1 y A_{24} . La vacuna oleosa serie 396, bivalente fue estudiada frente al virus O_1 . Con referencia a la vacuna oleosa 333, el Cuadro 19 presenta los ISP individuales de los bovinos de 9-10 meses usados por PANAFTOSA, así como los ISP individuales de los bovinos de 18-24 meses de edad que sufrieron descarga directa y las respectivas lesiones. En ambos grupos fueron calculadas las EPP.

Se puede observar que los resultados de la prueba de descarga concuerdan con los valores de las EPP. Sin embargo, se debe notar que dos animales con lesión en una pata, por lo tanto considerados como no protegidos en la prueba de descarga, tenían títulos de anticuerpos elevados.

El Cuadro 20 muestra los ISP individuales de los bovinos de 9-10 meses de edad, vacunados con la vacuna oleosa serie 396, así como las respectivas EPP. La descarga directa de virus O_1 en bovinos de 18-24 meses, vacunados con la misma vacuna, protegió 15/16 animales. Como se puede verificar, las EPP obtenidas en las pruebas indirectas se relacionan con los resultados de la descarga directa, aun cuando son utilizados sueros de animales más jóvenes mantenidos en condiciones de campo.

En la producción de vacunas, LARA, Campinas, utiliza la misma tecnología. Todas las partidas producidas son sometidas al control realizado por el órgano oficial del Ministerio de Agricultura y Reforma Agraria de Brasil, en pruebas directas de descarga de virus frente a una valencia. Además, esas vacunas son enviadas a PANAFTOSA para el control a través de las EPP.

El Cuadro 21 indica la correspondencia de valores entre las EPP y la generalización podal frente a la descarga de virus de 28 partidas sucesivas de vacunas producidas en los años 1985 y 1986. Los resultados de aprobación de la vacuna por pruebas directas en esa ocasión eran 13/16 animales protegidos, sin ninguna lesión podal. Si se comparan

In order for the Ministry of Agriculture and Agrarian Reform of Brazil to evaluate the results obtained by the semi-industrial production of PANAFTOSA a few batches of vaccine were submitted to official control. A trivalent oil-adjuvanted vaccine (batch 333) was examined by challenge with virus types O_1 and A_{24} . A bivalent vaccine (batch 396) was tested against virus type O_1 .

Table 19 presents the MPI of the in-house test done by PANAFTOSA with 9-10 month-old cattle and the MPI and lesion development of the 18-24 months old cattle which were challenged. The EPP was calculated for both groups.

It can be seen that the results of the challenge test agree with the EPP values. However, it is notable that the two animals with one foot lesion had considerable protection according to their antibody levels.

Table 20 lists the individual MPI and the respective EPP of the cattle vaccinated with a bivalent oil-adjuvanted vaccine (batch 396). Direct challenge with O_1 virus of 18-24 month-old cattle vaccinated with the same vaccine protected 15/16 animals. As can be seen, the results of EPP correlated well with the direct challenge results, even though the EPP values were obtained in much younger cattle, maintained under field conditions.

LARA, Campinas, produced vaccines according to the PANAFTOSA production technology. All batches produced were submitted for potency tests by the official agency of the Ministry of Agriculture and Agrarian Reform of Brazil, in direct challenge tests against a single virus type. Moreover, these vaccines were forwarded to PANAFTOSA for evaluation by the EPP method.

Table 21 lists the EPP values and the results of the challenge tests of 28 successive batches of oil-adjuvanted vaccine produced in 1985-86. The pass mark for the vaccine was 13/16, with any animal showing a foot lesion being considered as not protected. The results compared to the EPP show agreement for the majority of the batches. However, it must be noted that the results of the EPP were from sera of 9-10 month-old calves vaccinated by PANAFTOSA and not from the 18-24 month-old cattle used in the

CUADRO 19. Vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso producida por PANAFTOSA. Serie 333
TABLE 19. Foot-and-mouth disease oil-adjuvanted vaccine produced by PANAFTOSA. Batch 333

Bovinos ^a 9-10 meses Cattle ^a 9-10 months			Bovinos ^a 18-24 meses Cattle ^a 18-24 months				
Nº bovino No. cattle	ISP/MPI		Nº bovino No. cattle	ISP/MPI	PGP	ISP/MPI	PGP
	O ₁	A ₂₄		O ₁		A ₂₄	
01	>5.15	>5.60	01	2.85		3.91	
02	5.15	5.25	02	2.85		3.91	
03	4.75	5.35	03	5.60		>5.40	
04	3.40	4.35	04	5.32		0.65	3P/F
05	4.35	5.20	05	3.20		3.40	1P/F
06	>5.15	>5.60	06	3.82		4.47	
07	>5.15	>5.60	07	5.60		4.51	
08	>5.15	>5.60	08	2.60	1P/F	3.40	
09	>5.15	>5.60	09	>5.60		4.40	
10	>5.15	>5.60	10	5.20		≤1.90	
11	>5.15	5.25	11	2.20		5.15	
12	>5.15	2.60	12	2.85		3.90	
13	4.65	4.80	13	4.60		5.05	
14	1.75	2.60	14	2.20		5.40	
15	4.00	4.29	15	≤1.10	2P/F	>5.40	
16	4.15	3.20	16	4.35		2.90	
17	>5.15	5.60					
18	3.90	5.02					
19	4.57	4.45					
20	4.40	2.35					
EPP			EPP				
X	97.8	97.8	X	93.30		93.80	
DS	5.1	3	DS	11.10		14.90	
ESM	1.1	0.7	ESN	2.80		3.70	
LC	95.9	96.5	LC	88.40		87.30	
			PGP ₅₀	87.50		87.50	

^a Animales usados en el control oficial de vacunas./Animals used in official vaccine control.

ISP/MPI = Índice de seroprotección./Mouse protection index.

PGP = Protección a la generalización podal./Protection against foot generalization.

DS = Desviación estándar./Standard deviation.

ESM = Error estándar de la media./Mean standard error.

LC = Límite de confianza./Confidence limit.

P/F = Pata/Foot.

las EPP se observa que hay reciprocidad de aprobación en la mayoría de las partidas. Sin embargo hay que tener en cuenta que los resultados de las EPP no fueron obtenidos de los sueros de los bovinos de 18-24 meses de edad utilizados en el laboratorio oficial de control (LARA, Porto Alegre), sino de terneros de 9-10 meses de edad vacunados con la misma vacuna en Rio de Janeiro. Esa diferencia de edad y el manejo de los animales no parece

challenge test at the official vaccine control laboratory (LARA, Porto Alegre). With oil-adjuvanted vaccine this difference in age and management of the animals appears no to have influenced the results.

CUADRO 20. Vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso producida por PANAFTOSA. Serie 396. 9-10 meses. Índice de seroprotección (ISP)

TABLE 20. Foot-and-mouth disease oil-adjuvanted vaccine produced by PANAFTOSA. Batch 396. 9-10 months. Mouse protection index (MPI)

Nº bovinos No. cattle	O ₁ Campos	A ₂₄ Cruzeiro
01	>5.36	>5.25
02	4.49	4.35
03	>5.36	4.75
04	4.70	4.75
05	>5.36	4.51
06	4.96	2.00
07	4.86	2.85
08	>5.36	3.75
09	2.60	4.05
10	>5.60	>4.75
11	>5.60	4.95
12	>5.60	>4.75
13	>5.60	>4.75
14	>5.60	4.75
15	3.00	2.00
16	>5.60	>4.75
17	>5.60	4.35
18	>5.60	2.45
19	4.94	4.75
20	>5.60	4.75
21	5.10	2.35
22	4.20	>4.75
23	5.60	3.15

Expectativas porcentuales de protección (EEP)		
Expected percentage of protection (EPP)		
X	98.6	96.4
DS	1.6	5.5
ESM	0.3	1.2
LIC	98.1	94.3
PGP	93.75	—

X = Media de las EPP. / Mean of EPP.

DS = Desvío estándar. / Standard deviation.

ESM = Error estándar de la media. / Mean of standard error.

LIC = Límite inferior de confianza. / Lower confidence limit.

PGP = Protección a la generalización podal. / Protection to foot generalization.

CUADRO 21. Valores de las expectativas porcentuales de protección (EPP) y de descarga directa de virus. Vacunas oleosas producidas por LARA, Campinas, Brasil, 1985-86

TABLE 21. Expected percentage of protection (EPP) and intradermolingual virus challenge results. Oil-adjuvanted vaccines produced by LARA, Campinas, Brazil, 1985-86

Nº de serie No. of series	EPP LIC ^a	Control oficial PGP ^b Official control PGP ^b	Tipo de virus Type of virus
025	91.7	15/16	A Venceslau
026	88	14/16	O ₁ Campos
027	92	16/16	O ₁ Campos
028	97.4	12/16 - 16/16 ^c	C ₃ Indaial
029	95.2	16/16	O ₁ Campos
030	99	16/16	O ₁ Campos
031	93	15/16	O ₁ Campos
032	93.8	15/16	O ₁ Campos
033	91.7	14/16	A ₂₄ Cruzeiro
034	95.5	12/16 - 12/16 ^c	O ₁ Campos
035	99	8/16 - 12/16 ^c	O ₁ Campos
036	91.6	14/15	O ₁ Campos
037	97.5	14/16	O ₁ Campos
038	93.3	13/16	O ₁ Campos
039	86.8	15/16	A Venceslau
040	94.5	15/16	O ₁ Campos
041	89.1	15/16	O ₁ Campos
042	91.1	11/16 - 14/16 ^c	O ₁ Campos
043	91.5	16/16	O ₁ Campos
044	93.8	14/15	O ₁ Campos
045	97.1	16/16	O ₁ Campos
046	97.9	14/16	O ₁ Campos
047	98.5	15/16	O ₁ Campos
048	91	13/15	A Venceslau
049	94.8	15/16	A Venceslau
050	96.7	15/16	O ₁ Campos
051	86.9	13/16	O ₁ Campos
052	96.8	13/16	O ₁ Campos

^aLímite inferior de confianza de la EPP. / Lower confidence limit of EPP.

^bProtección de la generalización podal. Protegidos/Total. / Protection against foot generalization. Protected/Total.

^cReexamen de la prueba directa. / Challenge retested.

Fuente/Source: PANAFTOSA/LARA Porto Alegre/LARA Campinas.

influir tanto cuando se usan vacunas de adyuvante oleoso.

Este cuadro indica la posible falibilidad de la prueba de descarga. Por ejemplo, el límite inferior de confianza en las series 028, 035 y 042 fue por encima de 90% de protección medido por serología. Sin embargo, la prueba de descarga indicó una protección más baja. Cuando reexaminados por descarga, un número considerable de animales estaba protegido. Con la serie 034 se obtuvo la misma protección.

The data also indicate the weakness of the direct challenge test. See for example the results of batches 028, 035 and 042, with an EPP over 90%. The first challenge results were low, but when retested in the challenge test most of the results were much higher. Batch 034 gave the same protection.

El Cuadro 22 contiene la información de las pruebas de protección a la generalización podal bovino en dos series de vacuna de LARA, Campinas, controladas en LARA, Porto Alegre, laboratorio de control oficial del Ministerio de Agricultura y Reforma Agraria de Brasil, hasta 12 meses (serie LARA 003) y 24 meses (serie LARA 015) después de su producción. Los datos muestran la estabilidad e inmunogenicidad de las vacunas durante los períodos indicados.

El Cuadro 23 muestra los valores del ISP, también expresados como límite inferior de confianza, de todas las valencias de las 13 series de vacunas producidas en LARA, Campinas, en 1987, el número de bovinos utilizados en cada prueba y los resultados del control oficial.

Pay (60, 61) y Suttmöller (65) demostraron que con un número pequeño de animales usados en las pruebas de desafío, tales resultados pueden ocurrir debido a variaciones estadísticas. Ellos argumentaron que los resultados de las pruebas serológicas cuantitativas tienen un grado más elevado de validez estadística que el desafío de un número pequeño de animales. El problema con el número de

Table 22 lists the data of two oil-adjuvanted vaccines produced by LARA, Campinas, tested by direct challenge at the official vaccine control laboratory LARA, Porto Alegre, of the Ministry of Agriculture and Agrarian Reform. Batches LARA 003 and LARA 015 had been in storage for 12 and 24 months after production, respectively, prior to testing.

Table 23 shows the MPI, expressed as lower confidence limit of the mean EPP of all valencies of 13 batches of oil-adjuvanted vaccine produced in LARA, Campinas, in 1987, as well as the number of cattle used and the official test results.

Pay (60, 61) and Suttmöller (65) demonstrated that with the small number of animals used in the test system such results can occur by statistical variation alone. They argue that the results of quantitative serological tests statistically have a higher degree of reliability than the challenge of a relative small number of animals. Another problem with the challenge test, as mentioned

CUADRO 22. Vacunas oleosas antiaftosa. Reproducibilidad y estabilidad de la respuesta a la protección a la generalización podal (PGP)

TABLE 22. Foot-and-mouth disease oil-adjuvanted vaccines. Reproducibility and stability of protection against generalization

Vacuna/ Vaccine	Replicaciones a través del tiempo / Replications through time												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Total
Meses/ Months ^a													
LARA													
003	13/15	16/16	12/16	12/15	13/16	14/16	13/16						93/110
Meses/ Months	3	4	8	9	10	11	11						
LARA													
015	16/16	16/16	13/16	16/16	14/15	16/16	14/16	15/16	15/16	15/16	16/16	14/16	180/191
Meses													
Months	4	6	7	9	10	11	15	17	20	23	23	24	

^aMeses después de la producción de la vacuna. / Months after vaccine production.

Fuente / Source: LARA, Porto Alegre, Ministerio de Agricultura y Reforma Agraria, Brasil.

LARA, Porto Alegre, Ministry of Agriculture and Agrarian Reform, Brazil.

CUADRO 23. Valores de las expectativas porcentuales de protección (EPP), expresados como límite inferior de confianza de 13 series de vacunas antiaftosa producidas por LARA, Campinas, Brasil, número de bovinos utilizados y resultados del control oficial, 1987

TABLE 23. Expected percentage of protection (EPP) values expressed as lower confidence limits of 13 batches of foot-and-mouth disease vaccines produced by LARA, Campinas, Brazil, number of cattle used and official control results, 1987

Nº bovinos ^a No. cattle ^a	Nº serie No. series	EPP (Límite inferior de confianza/ Lower confidence limit)					Control oficial Official control	
		O ₁	A ₂₄	A Venc.	C ₃ Ind.	PGP ^b	IC ^c	Tipo de virus Type of virus
18	001/87	94.4	74.2	78.4	91.1	9/16 16/16 ^d		O ₁ Campos
17	002/87	84.0	78.1	93.0	96.7	14/16		A Venceslau
19	003/87	81.6	93.9	86.6	92.2	14/16		A Venceslau
22	004/87	86.8	90.5	90.5	95.8	15/16		A Venceslau
22	005/87	91.1	85.9	76.4	94.6		≥3.1	A Venceslau
18	006/87	97.1	98.4	88.4	99.0	15/16		A Venceslau
21	007/87	86.5	87.3	79.7	98.6	13/16		O ₁ Campos
21	008/87	96.5	87.9	98.7	99.0	9/16 12/16 ^d		O ₁ Campos
20	009/87	86.1	81.9	75.7	97.9	14/16		A Venceslau
19	010/87	98.7	93.2	93.9	98.7	13/16		O ₁ Campos
20	011/87	94.4	95.4	91.5	98.7	11/16 12/16 ^d		O ₁ Campos
21	012/87	89.6	80.5	86.7	99.0		≥4.67	O ₁ Campos
21	013/87	86.6	74.0	81.1	94.7		≥4.7	O ₁ Campos

^aNúmero de bovinos vacunados para cada serie de vacuna examinada por EPP.

Number of cattle vaccinated for each vaccine batch tested by EPP.

^bProtección a la generalización podal. Protegidos/Total. / Protection against foot generalization. Protected/Total.

^cÍndice C en cobayos según Lucam y col. / C Index in guinea pigs according to Lucam *et al.*

^dReexamen de la prueba directa. / Retest of challenge.

Fuente / Source: PANAFTOSA, LARA (Campinas).

animales en la prueba de desafío se debe a que la evaluación se da sobre los animales generalizados aun cuando presenten lesiones en una pata. Si no desarrollan fiebre aftosa generalizada son considerados protegidos.

earlier, is the interpretation of a limited number of foot lesions. If an animal develops one foot lesion and does not generalize further it is definitely protected!!

5. CONCLUSIONS

5. CONCLUSIONES

PANAFTOSA y LARA han desarrollado una vacuna de adyuvante oleoso que produce una inmunidad más larga que las vacunas clásicas de HS. La vacuna ha sido producida en una escala industrial por las dos instituciones y la tecnología ha sido transferida con éxito a otros laboratorios de producción, oficiales y privados.

PANAFTOSA and LARA have developed an oil-adjuvanted FMD vaccine which produces a longer lasting immunity than the classical aluminum hydroxyde-saponine vaccines. The oil-adjuvanted vaccine has been produced on a semi-industrial scale by both institutions and the technology has been successfully transferred to production laboratories, both in the official and private sectors.

El esquema de vacunación recomendado es de dos dosis anuales en los animales jóvenes y revacunación anual de los animales de más de dos años de edad.

Se recomienda una cobertura superior a 80% en la población de áreas de vacunación sistemática.

La vacunación debe ser hecha de preferencia por vía intramuscular, que tiene buena aceptación por parte de los ganaderos.

La vacuna oleosa protege con éxito el ganado bovino contra la fiebre aftosa en el campo, en condiciones ecológicas diferentes, aplicada en diversas razas de bovinos y en condiciones de manejo muy diferentes en países tropicales y templados, y su costo es efectivo.

Los cerdos también pueden ser protegidos con éxito, pero en general el uso sistemático de la vacuna no es recomendado. Se recomienda la vacunación estratégica en áreas de riesgo.

Los ovinos son bien protegidos y muestran una inmunidad de larga duración.

Los controles deben ser hechos en cada etapa del proceso de producción para asegurar la integridad del producto final. Solo los productos (medios, sueros, virus, antígenos, etc.) con todos los valores de control dentro del límite normal pueden ser usados.

Con referencia al control de calidad de rutina de las vacunas antiaftosa concluimos que las pruebas serológicas con los resultados expresados como EPP son los métodos de elección, por las siguientes razones:

- control regular de todas las valencias de todas las vacunas, sin necesidad de llevar virus fuera del laboratorio;
- posibilidad de evaluar la duración de inmunidad frente a la vacunación y revacunación;
- posibilidad de verificar la inmunidad conferida por las vacunas frente a otras cepas de virus que aparezcan en el campo y compararlas experimentalmente con cepas heterólogas, usando el mismo número de animales;
- el menor costo de la prueba permite aumentar el número de animales, con lo que se reduce la variación;
- respuesta cuantitativa y no cualitativa;

The recommended vaccination scheme calls for two doses per year for young cattle and a yearly revaccination of all adult cattle.

A coverage of more than 80% of the cattle population is recommended for areas under systematic vaccination programs.

Preferably, the oil-adjuvanted vaccine is administered by the intramuscular route, which has proven to be well accepted by the cattle industry.

Oil-adjuvanted FMD vaccine protects cattle successfully against the disease in the field, under a variety of ecological conditions, different cattle breeds, under very diverse management conditions, both in tropical and temperate climates. Moreover, the use of oil-adjuvanted FMD vaccine is cost effective.

Swine can also be successfully protected with oil-adjuvanted FMD vaccine, but in general, the systematic application of the vaccine is not recommended. However, it can be used strategically in high risk areas.

Sheep can be well protected with oil-adjuvanted FMD vaccine and long lasting immunity has been observed in this species.

Quality control must be performed during each of the production steps of the vaccine in order to ensure the quality of the final product. Only components (cell media, virus, antigens, etc.) with all control parameters within the normal range must be used.

For the routine quality control of the final product we conclude that serological tests with the results expressed as EPP are the preferred methods for the following reasons:

- all valencies of all vaccines can be tested without need to bring virus outside the confinement of the laboratory;
- the duration of immunity can be evaluated after vaccination and revaccination;
- the protection induced by the vaccine can be verified against other strains which appear in the field and can be compared experimentally with heterologous strains, using the same sera;
- a larger number of cattle can be used at a relatively small increase in costs which allows a reduction of test variation;

- si una prueba se pierde por cualquier circunstancia, se puede repetir con los mismos sueros, a muy bajo costo;
- los animales se mantienen en su habitat natural y así, al evitar su transporte para unidades de aislamiento, se evita el "stress";
- no hay depreciación del valor del animal que al terminar la prueba puede completar su ciclo de producción;
- los animales no son sometidos a las condiciones de sufrimiento inhumano que significa la inoculación de virus y el mantenimiento de animales bravíos de campo en confinamiento sobre piso duro, hacinados y sometidos al frío en invierno e intenso calor en verano;
- la última razón, que por sí sola sería suficiente para justificar la no utilización de pruebas directas de desafío, es controlar el escape de virus; el riesgo permanecería al término de la prueba durante la eliminación de los bovinos, aun cuando su destino sea mataderos especiales.
- the response is quantitative instead of quantal;
- if for any reason the test goes wrong (which happens in any laboratory), it can be repeated at very little extra costs;
- stress is avoided because the test cattle remain in their natural habitat without the need of transportation to isolation units;
- the test cattle do not lose their market value at the end of the test, but can complete their growth cycle;
- the cattle are not submitted to inhumane suffering, caused by the inoculation of live virus, the confinement of unruly field animals on hard and rough floors, and exposure to the cold of winter and extreme heat in summer; and finally,
- the reason, which by itself alone is sufficient justification not to use direct challenge tests, is the difficulty in controlling the escape of virus into the environment during the tests as well as during the elimination of the test cattle at termination of the test, even if the destination is a special slaughterhouse.

AGRADECIMIENTOS

Por su contribución invaluable en el desarrollo de la vacuna antiaftosa de adyuvante oleoso agradecemos a los siguientes profesionales:

Vicente M. Astudillo; Hans G. Bahnmann; Horacio Barahona; Fernando P. Dora; Mário V. Fernandes; Aldo Gaggero; Homero Giacometti; Roberto Goic M.; Félix J. Rosenberg; Ubiratan Mendes Serrão; Paul Sutmöller; Yderzio L. Vianna Filho

Nuestro agradecimiento a los funcionarios del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa/Organización Panamericana de la Salud por su competencia, dedicación y eficiencia en el diario cumplimiento de sus funciones y responsabilidades.

ACKNOWLEDGEMENTS

The invaluable contributions of the following persons towards the development of the oil-adjuvanted foot-and-mouth disease vaccine is gratefully acknowledged:

Special gratitude is expressed towards the technical staff of the Pan American Foot-and-Mouth Disease Center/Pan American Health Organization for their continuous competency, efficiency and dedication.

REFERENCIAS — REFERENCES

1. ABARACON, D., ALONSO F., A., MAGALLANES, N., CHARLES, E.G., DURINI, L.A. Protección de bovinos después de vacunados con vacunas antiaftosas con adyuvante oleoso. Protection of cattle following vaccination with oil-adjuvanted foot-and-mouth disease vaccine. *Bol.Centr.Panam. Fiebre Aftosa*, 37-38: 41-43, 45-47, 1980.
2. ABARACON, D., MAGALLANES, N., CHARLES, E.G., DURINI, L.A., FRICK, E., FERNANDEZ DE ALBARRACIN, G., DEGIORGIO DE BURGH, E., RADISICH, T. Vida útil de una vacuna antiaftosa inactivada con adyuvante oleoso. Shelf life of inactivated oil-adjuvanted foot-and-mouth disease vaccine. *Bol.Centr.Panam. Fiebre Aftosa*, 37-38: 17-20, 21-24, 1980.
3. ABARACON, D., MESQUITA, J.A., SALLUA, A., PEREZ RAMA, R. Emulsificante Montanide 888 para la preparación de vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso. Montanide 888 emulsifying agent for preparation of oil adjuvanted foot-and-mouth disease vaccine. *Bol.Centr.Panam. Fiebre Aftosa*, 45-46: 51-53, 55-57, 1982.
4. AHL, R., WITTMANN, G. Further studies on the assessment of potency of FMD vaccines by means of antibody assays with sera from vaccinated cattle. In: *FAO. Rep.Sess.Res.Gp.Stand.Tech.Comm.Eur. Comm. Control FMD*. Rio de Janeiro, 15-18 Oct. 1985.
5. ALONSO F., A. Manual de diagnóstico de laboratorio de las enfermedades vesiculares. Rio de Janeiro, PANAFTOSA, 1986. (Ser.Man.Didact., 15).
6. ALONSO F., A., GOMES, M.P.D., MARTINS, M.A., SONDÄHL, M.S. Detection of foot-and-mouth disease virus infection associated antigen antibodies: comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay and agar gel immunodiffusion tests. *Prev.Vet. Med.*, 9: 233-240, 1990.
7. ALONSO F., A., ASTUDILLO, V., GOMES, I., ROCHA, J., AUGÉ DE MELLO, P. Laboratory diagnosis support in the field control of strain A Sabana-Colombia 1985. In: *FAO. Rep.Sess.Res.Gp. Stand.Tech.Comm.Eur.Comm. Control FMD*. Madrid, 14-17 Oct. 1986. p.49-52.
8. ALONSO F., A., CASAS OLASCOAGA, R., FERNANDEZ, R.G., VIANNA FILHO, Y.L., SONDÄHL, M.S., GOMES, I., ASTUDILLO, V.M., AUGÉ DE MELLO, P., BAHNEMANN, H.G. Caracterización epidemiológica, antigénica, inmunogénica y bioquímica del virus de la fiebre aftosa A-81 Argentina/87. Epidemiologic, antigenic, immunogenic and biochemical characterization of aphthovirus A-81 Argentina/87. *Bol.Centr.Panam. Fiebre Aftosa*, 53: 31-36, 37-42, 1987.
9. ALONSO F., A. *et al.* Evolución de la producción y el control de calidad de la vacuna antiaftosa en América del Sur. Rio de Janeiro, PANAFTOSA, 1989. (Ser.Monog.Cient.Téc., 17). En prensa. In press.
10. AMADORI, M., BAREI, S., BUGNETTI, M., PANINA, G.F. Correlation between antibody level and response to challenge in FMD vaccinated cattle. Results for "A" and "C" types. In: *FAO. Rep.Sess. Res.Gp.Stand.Tech.Comm.Eur.Comm.Control FMD*. Rio de Janeiro, 15-18 Oct. 1985.
11. ASTUDILLO, V.M., AUGÉ DE MELLO, P. Análisis del costo y de la efectividad de dos procedimientos de vacunación antiaftosa. Cost and effectiveness analysis of two foot-and-mouth disease vaccination procedures. *Bol.Centr.Panam. Fiebre Aftosa*, 37-38: 49-55, 57-63, 1980.
12. ASTUDILLO, V., GOMES, I., WANDERLEY, M. Precisión de la prueba de seroprotección en la evaluación del nivel de anticuerpos de fiebre aftosa. Precision of the mouse protection test in evaluating foot-and-mouth disease antibody levels. *Bol.Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 23-24: 25-31, 1976.
13. AUGÉ DE MELLO, P. Prueba de neutralización por reducción de placas para la evaluación de anticuerpos contra la fiebre aftosa. Comunicación breve. Plaque reduction neutralization test for the assay of antibodies against foot-and-mouth. Brief report. *Bol.Centr.Panam. Fiebre Aftosa*, 21-22: 25-29, 30-34, 1976.
14. AUGÉ DE MELLO, P. Consideraciones sobre la profilaxis de la fiebre aftosa en la especie porcina. Reflections on the prevention of foot-and-mouth disease in swine. *Bol.Centr.Panam. Fiebre Aftosa*, 35-36: 55-58, 59-61, 1979.
15. AUGÉ DE MELLO, P. El uso de la vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso en áreas endémicas. The use of oil-adjuvanted foot-and-mouth disease vaccine in endemic areas. *Bol.Centr.Panam. Fiebre Aftosa*, 45-46: 23-32, 33-42, 1982.
16. AUGÉ DE MELLO, P., ASTUDILLO, V.M., GOMES, I., CAMPOS GARCIA, J.T. Aplicación en el campo de vacuna antiaftosa oleosa e inactivada: vacunación y revacunación de bovinos jóvenes. Field application of inactivated oil adjuvanted foot-and-mouth disease vaccines: vaccination and revaccination of young cattle. *Bol.Centr.Panam. Fiebre Aftosa*, 19-20: 31-38, 39-47, 1975.
17. AUGÉ DE MELLO, P., ASTUDILLO, V., GOMES, I., CAMPOS GARCIA, J.T. Respuesta inmunitaria de bovinos adultos vacunados contra la fiebre aftosa con vacuna oleosa. Immune response of adult cattle vaccinated with oil adjuvanted foot-and-mouth disease vaccines. *Bol.Centr.Panam. Fiebre Aftosa*, 26: 23-25, 27-29, 1977.

18. AUGÉ DE MELLO, P., GOMES, I. Vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso para cerdos. I. Vacuna de emulsión doble aplicada por diferentes vías. Foot-and-mouth disease oil adjuvanted vaccines for pigs. I. Double emulsion vaccine applied by different routes. *Bol.Centr.Panam. Fiebre Aftosa*, 31-32: 1-6, 7-12, 1978.
19. AUGÉ DE MELLO, P., GOMES, I., ALONSO F., A., MASCARENHAS, J.C. Vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso para cerdos. II. Vacunación intraperitoneal de cerdos jóvenes con emulsión doble. Foot-and-mouth disease oil adjuvanted vaccine for pigs. II. Intraperitoneal vaccination of young pigs with double emulsion vaccine. *Bol.Centr.Panam. Fiebre Aftosa*, 31-32: 13-19, 21-27, 1978.
20. AUGÉ DE MELLO, P., GOMES, I., BAHNEMANN, H.G. La vacunación de bovinos jóvenes con una vacuna antiaftosa de adyuvante oleoso. The vaccination of young cattle with an oil adjuvant foot-and-mouth disease vaccine. *Bol.Centr.Panam. Fiebre Aftosa*, 55: 3-8, 9-14, 1989.
21. BACHRACH, H.L., MOORE, D.M., MCKERCHER, P.D., POLATNICK, J. An experimental submit vaccine for foot-and-mouth disease. *Dev.Biol.Stand.*, 35: 155-160, 1977.
22. BAHNEMANN, H.G. Binary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccines production. *Arch.Virol.*, 47(1): 47-56, 1975.
23. BERLIN, B.S. Tests for biologic safety of Arlacel A. *Ann.Allergy*, 20: 472-479, 1962.
24. BROWN, F., CRICK, J. Application of agar-gel diffusion analysis to a study of the antigenic structure of inactivated vaccines prepared from the virus of foot-and-mouth disease. *J.Immunol.*, 82: 444-447, 1959.
25. CASAS OLASCOAGA, R. Summary of current research of the Pan American Foot-and-Mouth Disease Center on oil adjuvanted vaccines. *Bull.Off.int.Epiz.*, (11-12): 1015-1054, 1978.
26. CLARKE, J.B., SPIER, R.E. Studies on the susceptibility to FMDV of BHK cell cultures derived from different sources. International Symposium on Foot-and-Mouth Disease, Lyon, 1976. *Dev.Biol.Stand.*, 35: 61-66. Basel: S. Karger, 1977.
27. COWAN, K.M. Antibody response to viral antigens advances in immunology. Ed. Dixon, F.V., Kundel, H.G., 1973. V.17.
28. CUNHA, R.G., BAPTISTA Jr., J.A., SERRAO, 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.*, B.Aires, 19(110): 243-267, 1957.
29. CUNLIFFE, H.R., GRAVES, J.H. Formalin-treated foot-and-mouth disease virus: comparison of two adjuvants in cattle. *Can.J.comp.Med.Vet.Sci.*, 27(8): 193-197, 1963.
30. DANNACHER, G., FEDIDA, M. Potency testing of FMD vaccines by the K-index method. In: *FAO. Rep.Sess.Res.Gp.Stand.Tech.Comm. Eur. Comm. Control FMD*, Rio de Janeiro, 15-18 Oct. 1985.
31. DORA, J.F.P., NUNES, J.C.C., SILVEIRA, J.C.G. da, JORGENSE, E.N., ROSENBERG, F.J., ASTUDILLO, V.M. Epidemia de fiebre aftosa en Bagé, RS, Brasil, 1980. Evaluación de dos sistemas de vacunación. Epidemic of foot-and-mouth disease in Bagé, RS, Brazil, 1980. Evaluation of two systems of vaccination. *Bol.Centr.Panam. Fiebre Aftosa*, 49-50: 3-9, 11-17, 1984.
32. FEDIDA, M., DANNACHER, G., COUBERT, M., PERRIN, M., MARTEL, J.L. Le contrôle d'activité des vaccins antiaphteux. *Dev.Biol.Stand.*, 35: 243-270, 1984.
33. FERREIRA, M.E.V. Prueba de microneutralización para estudios de anticuerpos de la fiebre aftosa. Comunicación breve. Microtiter neutralization test for the study of foot-and-mouth disease antibodies. Brief report. *Bol.Centr.Panam. Fiebre Aftosa*, 21-22: 17-20, 21-24, 1976.
34. FONTAINE, J., TERRE, J. Le contrôle des vaccins antiaphteux inactivés. *Rev.Méd.vét.*, 122: 289-322, 1971.
35. FRESCURA, T., DURANTI, G. Efficacia di un vaccino antiaftoso trivalente OAC concentrato. *Atti Soc.ital.Sci.vet.*, 23: 982-986, 1969.
36. FREUND, J., CASALS, J., HOSMER, E.P. *Proc.Soc. Exper.Biol.*, 37: 509, 1937.
37. GAGGIANO, C.H., GIMENO, E.J., TKACICK, E., VILCHES, A.M. Aplicación experimental a campo de vacuna con adyuvante oleoso en la República Argentina. 16th Conf. OIE FMD Commission. Paris, 14-17 Sep. 1982. V.1, p.223-241.
38. GEBAUER, F., LA TORRE, J.L., GOMES, I., MATEU, M.G., BARAHONA, H., TIRABOSCHI, B., BERGMANN, I.E., AUGÉ DE MELLO, P., DOMINGO, E. Rapid selection of genetic and antigenic variants of FMDV during persistence in cattle. *J.Virol.*, 62(6): 2041-2049, 1988.
39. GOMES, I. Persistencia de anticuerpos circulantes en porcinos revacunados con vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso. Persistence of circulating antibodies in swine revaccinated with oil-adjuvanted foot-and-mouth disease vaccine. *Bol.Centr.Panam. Fiebre Aftosa*, 39-40: 43-45, 47-49, 1980.
40. GOMES, I., ASTUDILLO, V. Foot-and-mouth disease: evaluation of mouse protection test results in relation to cattle immunity. *Bol.Centr.Panam. Fiebre Aftosa*, 17-18: 9-16, 1975.

41. GOMES, I., AUGÉ DE MELLO, P., ALONSO F., A., COSTA, K.F. Vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso para cerdos. III. Respuesta inmunitaria con vacunas emulsificadas por vibración ultrasónica o por agitación mecánica. Foot-and-mouth disease oil adjuvanted vaccines for pigs. III. Immune response of vaccines emulsified by ultrasonic or mechanical equipment. *Bol.Centr.Panam. Fiebre Aftosa*, 35-36: 19-25, 27-33, 1979.
42. GOMES, I., SUTMÖLLER, P., CASAS OLASCOAGA, R. Respuesta en bovinos a la exposición del virus de la fiebre aftosa un año después de inmunizados con vacuna con adyuvante oleoso. Response of cattle to foot-and-mouth disease (FMD) virus exposure one year after immunization with oil-adjuvanted FMD vaccine. *Bol.Centr.Panam. Fiebre Aftosa*, 37-38: 25-29, 31-35, 1980.
43. GOIC MARTINIC, R. Evaluación de la vacuna antiaftosa de adyuvante oleoso en Rio Grande do Sul, Brasil y en Uruguay. 1976 a 1987. Rio de Janeiro, PANAFTOSA, 1988.
44. Guide to good pharmaceutical manufacturing practice. London, 1983.
45. HENDERSON, W.M., GALLOWAY, I.A. The use of culture virus in the preparation of FMD vaccine. *J.Hyg., Camb.*, 51: 546-558, 1953.
46. HERBERT, W.T. Multiple emulsions. A new form of mineral oil antigen adjuvant. *Lancet*, 16: 771, 1965.
47. LUCAM, F., FEDIDA, M. Une nouvelle méthode quantitative pour l'appréciation de l'immunité antiaphteuse. *Bull.Off.int.Epiz.*, 49: 596-621, 1958.
48. LUCAM, F., FEDIDA, M., DANNACHER, G. Le contrôle officiel français des vaccins antiaphteux. *Bull.Off.int.Epiz.*, 65: 385-418, 1966.
49. McKERCHER, P.D. Response to swine to oil adjuvanted vaccine. *International Symposium of Foot-and-Mouth Disease*, 8: 151-160, 1967.
50. McKERCHER, P.D., GAILIUNAS, P. Response of swine to inactivated foot-and-mouth disease vaccines. Duration of immunity and local tissue reaction. *Arch.ges.Virusforsch.*, 28(2): 165-176, 1969.
51. MEBUS, C.A., AUGÉ DE MELLO, P. Examen histológico en cerdos vacunados con vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso. Histological examination of pigs vaccinated with oil-adjuvanted foot-and-mouth disease vaccine. *Bol.Centr.Panam. Fiebre Aftosa*, 43-44: 3-11, 13-20, 1981.
52. MESQUITA, J.A., SUTMÖLLER, P., CASAS OLASCOAGA, R. Control of the production of foot-and-mouth disease vaccines under good manufacturing practices (GMP). Presentado en el XXIV World Vet. Congress.
53. MOWAT, G.N. Potency testing of FMD vaccines in the U.K. In: *FAO. Rep.Sess.Res.Gp.Stand.Tech. Comm.Eur.Comm. Control FMD*. Rio de Janeiro, 15-18 Oct. 1985.
54. MOWAT, G.N. A comparison of the adjuvant effects of saponin and oil emulsions in foot-and-mouth disease vaccines for cattle. *Bull.Off.int.Epiz.*, 81: 1319-1334, 1974.
55. OPS. PROASA. *Producción, control de calidad y uso de vacunas con adyuvante oleoso contra la fiebre aftosa*. Washington, D.C., OPS/OMS/BID, 1987.
56. OPS. PROASA. *Producción, control de calidad y uso de vacunas con adyuvante oleoso contra la fiebre aftosa*. Anexo IV, Banco de sueros. In: OPS. PROASA. Washington, D.C., OPS/OMS/BID, 1987. p.233-240.
57. OUCHTERLONY, O. *Handbook of immunodiffusion and immunoelectrophoresis*. Ann Arbor, Michigan, Ann. Arbor. Sci. Publ., 1968.
58. PANAFTOSA. Relatório final projeto Valença. 1977-1980. Rio de Janeiro, PANAFTOSA, 1983. 60p.
59. PAY, T.W.F. Quelques problèmes statistiques et biologiques inhérents aux tests du pouvoir immunisant du vaccin antiaphteux. IV Journées Argent. de Microbiol. Buenos Aires, 7-11 Juin 1976.
60. PAY, T.W.F. A review of quality control methods. *Br.Vet.J.*, 134: 76, 1978.
61. PAY, T.W.F., PARKER, N.J. Some statistical and experimental design problems in the assessment of FMD vaccine potency. *Dev.Biol.Stand.*, 35: 369-383, 1977.
62. ROCHA, J.R.R., BARRERA, V.J. del C., BUSTOS, M.Q. Respuesta inmunitaria inducida por vacuna antiaftosa oleosa en bovinos de áreas tropicales de Colombia. Immune response induced by oil-adjuvant foot-and-mouth disease vaccine in cattle in tropical areas of Colombia. *Bol.Centr.Panam. Fiebre Aftosa*, 47-48: 35-44, 45-54, 1983.
63. STELLMANN, C., BORNAREL, P., LANG, R., TERRE, J. Contrôle quantitatif du vaccin antiaphteux. Analyse statistique de la relation liant les titres d'anticorps neutralisants au pourcentage de protection bovine. *Rech.Méd.Vet.*, 144(4): 325-351, 1968.
64. STELLMANN, C., TERRE, J., ROUMIANTZEFF, M., BORNAREL, P. Contrôle quantitatif du vaccin antiaphteux. III. Analyse statistique par la méthode de Litchfield. *Rev.Méd.Vét.*, 116: 609-615, 1965.
65. SUTMÖLLER, P. Computer simulation of foot-and-mouth disease vaccine potency test. *Prev.Vet.Med.*, 4: 329-339, 1986.
66. SUTMÖLLER, P., GOMES, I., ASTUDILLO, V. Estimación de potencia de vacunas contra la fiebre aftosa de acuerdo con los resultados de pruebas de anticuerpos. Potency estimation of FMD vaccines according to antibody assay results. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 49-50: 27-30, 31-34, 1984.

-
67. SUTMÖLLER, P., COSTA, K. de F., GOMES, I. Prueba de seroneutralización por microtécnica para fiebre aftosa: cálculo de la expectativa porcentual de protección. The serum microneutralization test for foot-and-mouth disease: establishment of an expected percentage of protection. *Bol.Centr.Panam. Fiebre Aftosa*, 39-40: 31-36, 37-42, 1980.
68. TERRE, J., BORNAREL, P., STELLMANN, C., SOULEBOLT, J.P. Contrôle quantitatif du vaccin antiaphteux. Détermination de la dose vaccinante 50% chez le bovin. *Rech.Méd.Vet.*, 141: 1109-1130, 1965.
69. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. PAHO. Vacunas contra la fiebre aftosa. I. Comparación entre vacunas preparadas con virus inactivado con formalina y adsorbido en hidróxido de aluminio y vacunas preparadas con virus inactivado con acetiltileneimina con adyuvante incompleto de Freund. Foot-and-mouth disease vaccine. I. Comparison of vaccines prepared from virus inactivated with formalin and adsorbed on aluminium hydroxide gel with saponin and virus inactivated with acetyleneimine and emulsified with incomplete Freund's adjuvant. *Bol.Centr.Panam. Fiebre Aftosa*, 19-20: 1-8, 9-16, 1975.
70. VAN BEKKUM, J.G. Potency testing of FMD vaccines. In: *FAO. Rep.Sess.Res.Gp.Stand.Tech.Comm. Eur.Comm. Control FMD*. Rio de Janeiro, 15-18 Oct. 1985.
71. VIANNA FILHO, Y.L., FERNANDEZ, G., RAVISON, A.J., DURINI, L., ALONSO F., A. Correlation between 50% bovine protective dose (BPD₅₀) and percentage protection against foot generalization (PG) in FMD vaccine potency. In: *FAO. Rep.Sess. Res.Gp.Stand.Tech.Comm.Eur.Comm.Control FMD*. Rio de Janeiro, 15-18, Oct. 1985.

RESUMENES

ABSTRACTS

ACHARYA, R., FRY, E., STUART, D., FOX, G., ROWLANDS, D. BROWN, F.

Texto en inglés. *Nature*, 337(6209):709-716, 1989. Lab. Molec. Biophys., Oxford OX1 3QU, UK.

Estructura tridimensional del aftovirus en la resolución Å 2,9

Se determinó la estructura próxima a la resolución atómica por difracción de rayos X sin información de la fase experimental. El virus muestra semejanzas con otros picornavirus pero también varios aspectos singulares. El cañón o cavidad encontrado en otros picornavirus está ausente; esto tiene implicaciones importantes para la unión con las células. La parte más inmunogénica del cápside, que actúa como un potente péptido vacunal, forma una protrusión desordenada en la superficie del virus.

The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution

The structure was determined at close to atomic resolution by X-ray diffraction without experimental phase information. The virus shows similarities with other picornaviruses but also several unique features. The canyon or pit found in other picornaviruses is absent; this has important implications for cell attachment. The most immunogenic portion of the capsid, which acts as a potent peptide vaccine, forms a disordered protrusion on the virus surface.

BANUMATHI, N., RAO, B.U.

Texto en inglés. *Current Sci.*, 58(9):495-496, 1989. In: *Vet. Bull.*, 59(11):6377, 1989. Vet. Res. Inst., Bangalore 560 024, India.

Una nota sobre la cristalización del aftovirus

Los serotipos O, A, C y Asia 1 del aftovirus fueron cristalizados. Los cristales del tipo O formaron bipirámides hexagonales con 0,03 mm de largo y 0,02 mm de diámetro; los tipos A y C fueron agujas alargadas midiendo 0,21 de longitud y 0,24 mm transversalmente; los cristales del tipo Asia 1 fueron placas rectangulares y cuadradas de 0,03 mm. Los rayos X desestabilizaron los cristales.

A note on the crystallization of foot-and-mouth disease virus

Aphthovirus serotypes O, A, C, and Asia 1 were crystallized. Type O crystals were hexagonal bipyramids 0.03 mm long and 0.02 mm in diameter; types A and C were elongated needles measuring 0.21 mm in length and 0.24 mm across; type Asia 1 crystals were rectangular and square plates of 0.03 mm. The crystals were destabilized by X-ray.

BARNETT, P.V., OULDRIDGE, E.J., ROWLANDS, D.J., BROWN, F., PARRY, N.R.

Texto en inglés. *J. gen. Virol.*, 70(6):1483-1491, 1989. Dr. N.R. Parry, Dep. Virol., Wellcome Biotechnology Ltd., Langley Court, Beckenham, Kent BR3 3BS, UK.

Epítopes neutralizantes del aftovirus tipo O. I. Identificación y caracterización de tres sitios conformacionales independientes funcionalmente

Se produjeron once anticuerpos monoclonales neutralizantes (MAbs) contra la cepa del aftovirus O₁BFS 1860/67, y fueron caracterizados por su habilidad para unir antígenos virales y subvirales en diferentes pruebas de ELISA y por neutralizar los aislados tipo O heterólogos. Las variantes neu-

Neutralizing epitopes of type O foot-and-mouth disease virus. I. Identification and characterization of three functionally independent, conformational sites

Eleven neutralizing monoclonal antibodies (MAbs) were produced to the O₁BFS 1860/67 strain of foot-and-mouth disease virus (FMDV), and were characterized for their ability to bind viral and subviral antigens in different ELISA tests and to neutralize heterologous type O isolates.

tralizantes resistentes del virus homólogo, aisladas bajo presión de 5 de estos MAb, fueron usadas en pruebas de neutralización cruzada con los 11 anticuerpos. Se identificaron tres sitios neutralizantes conformacionales, funcionalmente independientes. El sitio conformacional más dependiente adsorbió el anticuerpo que neutralizó una serie de aislados de virus tipo O. El segundo sitio dependió menos de la conformación y fue reconocido por el anticuerpo con reactividad cepa-específico. El sitio menos conformacional adsorbió MAb que mostraron neutralización cruzada con otras cepas de tipo O. Este último sitio pareció ser inmunodominante, conteniendo varios epítopes superpuestos que mostraron algunas diferencias en sus especificidades. Estudios de isoelectroenfocado y secuenciamiento de las variantes sugirieron fuertemente que el polipéptido VP2 contribuye en la conformación del sitio inmunodominante.

Neutralization escape variants of the homologous virus, isolated under pressure from 5 of these MAb, were used in cross-neutralization tests with all of the 11 antibodies. Three functionally independent, conformational, neutralizing sites were identified. The most conformationally dependent site bound antibody which neutralized a range of type O virus isolates. A second site was less dependent on conformational and was recognized by antibody that was strain-specific. The least conformational site bound MAb which showed limited cross-neutralization of other type O strains. This latter site appeared to be immunodominant and contained several overlapping epitopes which showed some differences in their specificities. Isoelectrofocusing and sequencing studies of the variants strongly suggested that polypeptide VP2 contributes to the immunodominant site.

BAXT, B., GARMENDIA, A.E., MORGAN, D.O.

Texto en inglés. *Viral Immunol.*, 2(2):103-113, 1989. In: *Virol. & Aids Abstr.*, 22(8):6109-V22, 1989. Mol. Biol. Lab., USDA, ARS, NAA, Plum Island Animal Disease Center, P.O.Box 848, Greenport, NY 11944, USA.

Caracterización de anticuerpos anti-idiotipos contra anticuerpos monoclonales del aftovirus

Se usó una serie de siete anticuerpos monoclonales neutralizantes (nMAbs) contra el aftovirus tipo A₁₂ para producir anticuerpos policlonales anti-idiotipos (anti-ids) en conejos. Los anti-ids fueron semipurificados a través de columnas de afinidad isotópica y estudiadas la reacciones cruzadas por radioinmunoensayo de fase sólida. Los anti-ids contra los nMAbs del aftovirus no reaccionaron con receptores celulares para el virus pero fueron capaces de producir anticuerpos antivirales y, por lo tanto, deberán ser examinados como una vacuna alternativa para este virus.

Characterization of anti-idiotypic antibodies generated against foot-and-mouth disease virus neutralizing monoclonal antibodies

A series of seven neutralizing monoclonal antibodies (nMAbs) against type A₁₂ foot-and-mouth disease virus (FMDV) was used to induce polyclonal anti-idiotypic antibodies (anti-ids) in rabbits. The anti-ids were semi-purified through isotype affinity columns and assayed by solid-phase radioimmunoassay for cross-reactivity. Anti-ids to anti-FMDV nMAbs failed to react with cellular receptors for the virus, but were able to induce anti-viral antibody and thus should be examined as an alternative vaccine strategy for this virus.

BAXT, B., VAKHARIA, V., MOORE, D.M., FRANKE, A.J., MORGAN, D.O.

Texto en inglés. *J. Virol.*, 63(5):2143-2151, 1989. USDA, ARS, Plum Island Animal Disease Center, P.O.Box 848, Greenport, NY 11944, USA.

Análisis de sitios antigénicos neutralizantes en la superficie del aftovirus tipo A₁₂

Se usó una serie de siete anticuerpos monoclonales neutralizantes (nMAbs) contra el aftovirus

Analysis of neutralizing antigenic sites on the surface of type A₁₂ foot-and-mouth disease virus

A series of seven neutralizing monoclonal antibodies (nMAbs) directed against type A₁₂ foot-

tipo A₁₂ para generar variantes resistentes a la neutralización. Las pruebas de neutralización por reducción de placa y microneutralización mostraron que las variantes no fueron más neutralizadas por los nMAbs usados para producirlas, mientras que algunas de las variantes aún reaccionaban con los nMAbs en altas concentraciones de anticuerpos. Los resultados de los estudios de neutralización cruzada, tanto por neutralización de reducción de placa como por microneutralización, sugirieron la presencia de por lo menos un sitio antigénico inmunodominante en la superficie del aftovirus tipo A₁₂, así como la evidencia de un segundo sitio antigénico sobre la superficie viral. Dos de las variantes presentaron virulencia reducida en cultivo celular, como se evidenció por su inhabilidad para inhibir la síntesis de la proteína celular y una marcada reducción en las alteraciones morfológicas celulares producidas por el virus. El secuenciamiento de nucleótidos de los genomas de las variantes localizó tres epítopes del sitio antigénico principal sobre la VP1 y el cuarto epítipo sobre VP3 y VP1. El único epítipo del sitio menor parece residir solo en VP1.

and-mouth disease virus (aphthovirus) was used to generate neutralization-resistant variants. Both plaque reduction neutralization and microneutralization assays showed that the variants were no longer neutralized by the nMAbs used to generate them, although some of the variants still reacted with the nMAbs at high antibody concentrations. Results of cross-neutralization studies by both plaque reduction neutralization and microneutralization assays suggested the presence of at least one immunodominant antigenic site on the surface of type A₁₂ aphthovirus, along with evidence of a second antigenic site on the viral surface. Two of the variants had reduced virulence in tissue culture as evidenced by their inability to inhibit cellular protein synthesis and a marked reduction in virus-induced cellular morphological alterations. Nucleotide sequencing of the variant genomes placed three epitopes of the major antigenic site on VP1 and the fourth epitope on VP3 and VP1. The one epitope of the minor site appears to reside only on VP1.

BOLWELL, C., CLARKE, B.E., PARRY, N.R., OULDRIDGE, E.J., BROWN, F., ROWLANDS, D.J.

Texto en inglés. *J. gen. Virol.*, 70(1):59-68, 1989. Wellcome Biotechnology Ltd., Langley Court, Beckenham, Kent BR3 3BS, UK.

Mapeo del epítipo de aftovirus con anticuerpos monoclonales neutralizantes

Epítipes de la cepa A₂₂ Iraq 24/64 del aftovirus fueron mapeados con anticuerpos monoclonales (MAbs) por: i) una prueba indirecta de ELISA usando péptidos superpuestos, ii) producción de variantes resistentes neutralizantes contra cada MAb y iii) secuenciamiento de variantes resistentes neutralizantes. Los resultados muestran que el virus tiene por lo menos tres epítipes neutralizantes de superposición lineal dentro de un sitio antigénico principal en la VP1. La presencia de un segundo sitio conformacional fue detectada pero su posición en la partícula viral no fue localizada. Péptidos sintéticos con secuencias representando el sitio principal producen anticuerpos que tienen amplia actividad neutralizante cruzada con el suero policlonal o MAbs neutralizantes producidos con el virus contra una gama de aislados de campo.

Epitope mapping of foot-and-mouth disease virus with neutralizing monoclonal antibodies

Epitopes of strain A₂₂ Iraq 24/64 of foot-and-mouth disease virus have been mapped with monoclonal antibodies (MAbs) by: (i) an indirect ELISA using an overlapping set of peptides, (ii) production of neutralization escape variants against each MAb and (iii) sequencing of neutralizing escape variants. The results show that the virus has at least three overlapping linear neutralizing epitopes within a major antigenic site on VP1. The presence of a second, conformational site was detected but its position on the virus particle was not located. Synthetic peptides with sequences representing the major site elicit antibodies which have similar broad cross-neutralizing activity to polyclonal serum or neutralizing MAbs produced with the virus against a range of field isolates.

CLERCQ, K. de, STROBBE, T., VANOPDENBOSCH, E., DEBECQ, J., THEYS, H.

Texto en inglés. *Vet. Res. Communication*, 13:199-204, 1989. In: *FMD Bull.*, 27(3):89/60, 1989. Nat. Inst. Vet. Res., Groeselenberg 99, B-1180 Brussels, Belgium.

Respuesta serológica a una vacunación antiaftosa de refuerzo con cepas diferentes de las utilizadas en la vacuna primaria

Terneros jóvenes fueron vacunados con una vacuna antiaftosa belga y revacunados con la misma vacuna o con una vacuna extranjera. Hubo una respuesta serológica significativa a las cepas de la vacuna primaria después de la primera vacunación la que fue aún mayor en la revacunación. A uno y dos meses después de la revacunación no hubo diferencias significativas entre las respuestas a la revacunación con la vacuna idéntica a la primaria o con la vacuna antiaftosa extranjera. Se concluyó que la revacunación de terneros jóvenes es efectiva aun con una vacuna antiaftosa diferente de la vacuna primaria.

Serological response to a booster foot-and-mouth disease vaccination with strains different from the primary vaccine

Young calves were vaccinated with Belgian foot-and-mouth disease (FMD) vaccine and revaccinated with either the same vaccine or with a foreign FMD vaccine. There was a significant serological response to the primary vaccine strains after the first vaccination which was greater following revaccination. At one and two months after revaccination there was no significant difference between the responses to revaccination with vaccine identical to the primary vaccine or with the foreign FMD vaccine. It was concluded that revaccination of young calves is effective even with an FMD vaccine different from the primary vaccine.

CRAIG, J.C., PARKINSON, D., GOATLEY, L., KNOWLES, N.

Texto en inglés. *J. Biol. Stand.*, 17:281-289, 1989. Dep. Biol., Roche Products Limited, P.O.Box 8, Welwyn Garden City, Herts AL7 3AY, UK.

Prueba de sensibilidad y diferenciación de especificidad de anticuerpos monoclonales en ELISA con diferentes soluciones tampones de base

Se emplearon soluciones tampones de diferentes pH y potencia iónica como base para la adsorción de antígeno a microplacas. Su eficiencia para cubrir placas con antígenos del virus de la peste bovina y aftovirus fue estudiada por la técnica de ELISA con preparaciones de anticuerpos poli y monoclonales. Mientras que la adsorción del antígeno de la peste bovina con antisuero policlonal dependió mucho de la potencia iónica y del pH del tampón, la adsorción del antígeno del aftovirus antigénicamente activo fue relativamente no afectada por las condiciones del tampón. Ambos antígenos fueron óptimamente adsorbidos en 0,01 M de tampón fosfato, pH 8,0. Cuando se usaron anticuerpos monoclonales para detectar el antígeno hubo un mayor grado de dependencia del tampón de base que la encontrada con antisueros policlonales. Además, cuando ellos fueron usados para detectar el antígeno adsorbido bajo varias condiciones del tampón, los anticuerpos monoclonales

Assay sensitivity and differentiation of monoclonal antibody specificity in ELISA with different coating buffers

Buffers of different pH and ionic strength were employed as coating buffers for antigen adsorption to microtitre plates. Their efficiency for coating plates with rinderpest virus (RPV) and foot-and-mouth disease virus (FMDV) antigens was studied by ELISA with polyclonal and monoclonal antibody preparations. While the adsorption and detection of RPV antigen with polyclonal antiserum was highly dependent on the ionic strength and pH of coating buffer, adsorption of antigenically active FMDV antigen was relatively unaffected by the buffering conditions. Both antigens were adsorbed optimally in 0.01 M phosphate buffer, pH 8.0. When monoclonal antibodies were used to detect antigen, there was a greater degree of dependence on the coating buffer than that found with polyclonal antisera. Moreover, when they were used to detect antigen adsorbed under several buffering conditions, monoclonal antibodies showed a variety of preferred

mostraron una variedad de tampones preferidos. Se demostró la utilidad de esta reactividad diferenciada para distinguir la especificidad del epítipo.

buffers. The usefulness of this different reactivity in distinguishing epitope specificity is demonstrated.

DIEZ, J., MATEU, M.G., DOMINGO, E.

Texto en inglés. *J. gen. Virol.*, 70:3281-3289, 1989. Centro Biol. Molec. (CSIC-UAM), Univ. Autónoma Canto Blanco, 28049 Madrid, España.

Selección de variantes antigénicas de aftovirus en la ausencia de anticuerpos, como se evidenció por una prueba *in situ*

Variantes antigénicas de aftovirus de serotipo C (aislado C-S8cl) fueron seleccionadas a partir de pasajes en serie del virus en cultivo de células sin anticuerpos anti-aftovirus. Las variantes aumentaron de frecuencias de $>10^{-2}$ en la preparación inicial del aftovirus C-S8cl purificado en plaqueo, a 0,1 a 1 en poblaciones pasadas tres veces. La proporción de variantes antigénicas fue cuantificada usando una nueva inmunopueba de placa *in situ*. Un filtro de nitrocelulosa es aplicado a la capa de agar de una prueba de plaqueo de aftovirus, lo que permite la recuperación de virus infeccioso de placas individuales. Un segundo filtro es colocado directamente sobre la monocapa celular y adhiere virus suficiente para permitir la visualización colorimétrica de placas por una prueba de enzima ligada usando anticuerpos monoclonales (MAbs). Ya sea todas las placas, o una fracción de ellas, provenientes de pasajes de aftovirus no reaccionaron con el MAb 4G3, un anticuerpo que reconoce un epítipo localizado entre los residuos 144 a 150 del cápside de la proteína VP1. Algunas variantes rápidamente dominaron la población viral, y otras fueron mantenidas a niveles bajos. El ARN de virus sin reaccionar incluyó mutaciones que resultaron en sustituciones de aminoácido en el epítipo reconocido por MAb 4G3. Discutimos modelos para la selección de variantes antigénicas de aftovirus en la ausencia de anticuerpos, e implicaciones para la diversificación antigénica de ARN de virus.

Selection of antigenic variants of foot-and-mouth disease virus in the absence of antibodies, as revealed by an *in situ* assay

Antigenic variants of foot-and-mouth disease virus (FMDV) of serotype C (isolate C-S8cl) were selected upon serial passage of the virus in cell culture in the absence of anti-FMDV antibodies. The variants rose from frequencies of $>10^{-2}$ in the initial plaque-purified FMDV C-S8cl preparation, to 0.1 to 1 in three passaged populations. The proportion of antigenic variants was quantified using a new *in situ* plaque immunotest. A nitrocellulose filter is applied to the agar overlay of an FMDV plaque assay, and allows recovery of infectious virus from individual plaques. A second filter is placed directly on the cell monolayer and binds enough virus to permit colorimetric visualization of plaques by an enzyme-linked assay using monoclonal antibodies (MAbs). Either all or a fraction of plaques from passaged FMDV failed to react with MAb 4G3, an antibody that recognizes an epitope located within residues 144 to 150 of capsid protein VP1. Some variants rapidly dominated the viral population, and others were maintained at low levels. RNA from unreactive viruses included mutations that resulted in amino acid substitutions at the epitope recognized by MAb 4G3. We discuss models for the selection of antigenic variants of FMDV in the absence of antibodies, and implications for the antigenic diversification of RNA viruses.

DONALDSON, A.I., KITCHING, R.P.

Texto en inglés. *Res. Vet. Sci.*, 46(1):9-14, 1989. AFRC, Inst. Anim. Dis. Res., Pirbright Laboratory, Woking, Surrey GU24 0NF, UK.

Transmisión de la fiebre aftosa por bovinos vacunados después de desafío natural

Bovinos vacunados con una vacuna antiaftosa monovalente convencional tipo O₁ fueron desafia-

Transmission of foot-and-mouth disease by vaccinated cattle following natural challenge

Cattle vaccinated with a conventional monovalent type O₁ foot-and-mouth disease (FMD)

dos entre cuatro y 21 días después de la vacunación por breve exposición a aerosoles del virus producido en cerdos. La transmisión fue entonces evaluada manteniendo bovinos susceptibles junto con los animales vacunados y al examinar y observar todos los animales para comprobar síntomas de infección y enfermedad clínica. Los 18 bovinos vacunados tres semanas antes del desafío resistieron a la enfermedad clínica y, aunque cuatro contrajeron la infección subclínica, no hubo transmisión a los bovinos susceptibles en contacto. Uno de los dos grupos de bovinos vacunados dos semanas antes transmitió infección subclínica, pero no la enfermedad, a los animales susceptibles alojados con ellos a partir del día 0 después del desafío. La infección subclínica se manifestó por una viremia transiente que no fue seguida por una respuesta detectable de anticuerpos circulantes. En uno de los dos experimentos, períodos menores (siete o cuatro días) entre la vacunación y el desafío resultaron en transmisión de la enfermedad de animales vacunados normalmente a animales en contacto. El severo desafío presentado por los animales enfermos por contacto rompió la inmunidad de los animales vacunados. Los resultados indican que durante programas de vacunación de emergencia es aconsejable vacunar todos los animales susceptibles a la fiebre aftosa dentro de la zona de vacunación y que fuera de esa zona los animales vacunados deben mantenerse separados por lo menos tres semanas de los animales sin vacunar.

vaccine were challenged between four and 21 days after vaccination by short-term exposure to homologous airborne virus produced by pigs. Transmission was then assessed by housing susceptible cattle with the vaccinated animals and testing and observing all the animals for signs of infection and clinical disease. All 18 cattle vaccinated three weeks before challenge resisted clinical disease and although four contracted subclinical infection, there was no transmission to susceptible cattle in contact. One of the two groups of cattle vaccinated two weeks previously transmitted subclinical infection, but not disease, to susceptible animals housed with them from day 0 after challenge. Subclinical infection was manifested by a transient viraemia which was not followed by a detectable circulating antibody response. Shorter periods (seven or four days) from vaccination to challenge resulted in transmission of disease from clinically normal vaccinated to in-contact animals in one of two experiments. The severe challenge presented by the diseased in-contact animals then overwhelmed the immunity of the vaccinated animals. The results indicate that during emergency vaccination programmes it is advisable to vaccinate all FMD-susceptible animals within the vaccination zone and that the outer boundary of the zone vaccinated animals should be kept separated from unvaccinated animals for at least three weeks.

GARMENDIA, A.E., MORGAN, D.O., BAXT, B.

Texto en inglés. *Immunology*, 68(2):265-271, 1989. Dr. B.Baxt, Molec. Biol. Lab., USDA, ARS, Plum Island Animal Disease Center, P.O.Box 848, Greenport, NY 11944, USA.

Anticuerpos neutralizantes de aftovirus producidos en ratones por anticuerpos anti-idiotipos

Un anticuerpo monoclonal neutralizante (nmAb) del aftovirus fue usado como anticuerpo-1 (AB1) para producir anticuerpos anti-idiotipos (a-IIdAb) en conejos. Los a-IIdAb (AB2) fueron aislados en proteína A-Sepharose, seguido por ciclos de separación sobre idiotipo y columnas de afinidad de isotipo. La especificidad del AB2 para el paratope de AB1 fue determinada por unión directa al AB1 en radioinmunoensayo de fase sólida (SP-RIA) y por RIA de competición (C-RIA) con

Foot-and-mouth disease virus-neutralizing antibodies induced in mice by anti-idiotypic antibodies

A neutralizing monoclonal antibody (nmAb) to foot-and-mouth disease virus (FMDV) was used as antibody-1 (AB1) to induce anti-idiotypic antibodies (a-IIdAb) in rabbits. The rabbit a-IIdAb (AB2) were isolated on protein A-Sepharose, followed by cycles of separation on idiotypic and isotype affinity columns. The specificity of the AB2 for the paratope of AB1 was determined by direct binding to AB1 in solid-phase radioimmunoassay (SP-RIA), and by competition RIA (C-RIA) con

virus para la unión al AB1. El AB2, denominado a-2PD11, fue utilizado para inmunizar seis grupos de hembras de ratones suizos a intervalos semanales con una de tres formulaciones, en dosis de 50 µg o 5 µg, aplicado por vía subcutánea (s.c.) en un único sitio. El anticuerpo antiviral (AB3) fue primero detectado por RIA en la quinta semana en los grupos de 50 µg/dosis, y los niveles máximos fueron alcanzados en la sexta semana en los grupos de 50 µg/dosis. Los niveles del AB3 fueron por lo menos tres veces más elevados en los ratones inoculados con 50 µg dosis. Además, los AB3 también neutralizaron infecciosidad por aftovirus en cultivo celular y en pruebas de protección en ratones lactantes. En total, los ratones mostraron respuestas variables a la inmunización con AB2. En un ensayo posterior, los ratones fueron inoculados semanalmente por vía s.c. en varios sitios y en la almohadilla plantar con 50 µg de un 2PD11 ligado a la molécula portadora de hemocianina (KLH). En estos ratones, el AB3 fue detectado antes que en los ratones inmunizados con inyecciones s.c. únicas. Estos resultados confirman el uso de a-IIdAb como substitutos potenciales de determinantes críticos para vacunas antiaftosa.

with virus for binding to the AB1. The AB2, termed a-2PD11, was utilized to immunize six groups of female Swiss mice at weekly intervals with either one of three formulations, in doses of 50 µg or 5 µg, given in single subcutaneous (s.c.) spots. Anti-viral antibody (AB3) was first detected by RIA at the fifth week in the 50 µg/dose groups, and maximum levels were reached at the sixth week in the 50 and 5 µg/dose groups. The AB3 levels were at least three times higher for mice given 50 µg doses. In addition, the AB3 were also shown to neutralize FMDV infectivity in tissue culture and in a suckling mouse protection assay. Overall, mice exhibited variable responses to immunization with AB2. In a subsequent trial, mice received multispot s.c. and footpad injections of 50 µg of a-2PD11 coupled to keyhole limpet haemocyanin (KLH) on a weekly basis. In these mice, AB3 was detected earlier than in mice immunized with single s.c. injections. These results support the use of a-IIdAb as potential surrogates of critical determinants for FMD vaccines.

MATEU, M.G., MARTINEZ, M.A., ROCHA, E., ANDREU, D., PAREJO, J., GIRALT, E., SOBRINO, F., DOMINGO, E.,

Texto en inglés. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 86(15):5883-5887, 1989. In: *Vet. Bull.*, 59(12):6993, 1989. Dr. E. Domingo, Centro Biol. Molec., Univ. Autónoma, Canto Blanco, 28049, Madrid, España.

Implicaciones de un genoma de estructura cuasi-especie: efecto de sustituciones naturales frecuentes de aminoácidos sobre la antigenicidad del aftovirus

Implication of a quasispecies genome structure: effect of frequent, naturally occurring amino acid substitutions on the antigenicity of foot-and-mouth disease virus

Se presenta evidencia de que la naturaleza cuasi-especie (extrema heterogenicidad genética) del aftovirus es importante para que el virus evite una respuesta inmunitaria. Un anticuerpo monoclonal que neutraliza la infectividad viral (clone SD6) reconoce un epítipo localizado alrededor de una secuencia altamente conservada (secuencia de aminoácido Arg-Gly-Asp-Leu-Ala en las posiciones 141-145) en la proteína VP1 del cápside del aftovirus de serotipo C₁. Las sustituciones de aminoácido Thr por Ala-138 e Ile (o Val) por Leu-147 redujeron 100 veces el título de unión del anticuerpo monoclonal SD6 a viriones o a la VP1. El efecto de

Evidence that the quasispecies nature (extreme genetic heterogeneity) of foot-and-mouth disease virus is relevant to the virus evading an immune response is presented. A monoclonal antibody neutralizing the viral infectivity (clone SD6) recognizes an epitope located around a highly conserved sequence (amino acid sequence Arg-Gly-Asp-Leu-Ala at positions 141-145) in the capsid protein VP1 of foot-and-mouth disease virus of serotype C₁. The amino acid substitutions Thr for Ala-138 and Ile (or Val) for Leu-147 reduced 100-fold the binding titre of monoclonal antibody SD6 to virions or to VP1. The effect

estas sustituciones fue reproducido cuantitativamente con péptidos sintéticos que representan las secuencias importantes. Esto demuestra que el reemplazo de los dos aminoácidos químicamente conservados —y ninguna otra sustitución presente en el virus cuasispecies— es responsable por la interacción modificada con el anticuerpo monoclonal neutralizante SD6. Las tres sustituciones fueron fijadas en el cápside viral durante una ocurrencia de fiebre aftosa y, además, ellas son de un tipo encontrado frecuentemente entre aislados de aftovirus independientes. Los resultados indican la extrema heterogenicidad del aftovirus como un importante elemento de la patogenesis viral.

of those substitutions was quantitatively reproduced with synthetic peptides representing the relevant sequences. This provides evidence that the two chemically conservative amino acid replacements —and not other substitutions present in the virus quasispecies— are responsible for the modified interaction with neutralizing monoclonal antibody SD6. The three substitutions were fixed in the viral capsid during one occurrence of foot-and-mouth disease and, furthermore, they are of a type found frequently among independent foot-and-mouth disease virus isolates. The results implicate the extreme heterogeneity of foot-and-mouth disease virus as an important element of viral pathogenesis.

McCAHON, D., CROWTHER, J.R., BELSHAM, G.J., KITSON, J.D.A., DUCHESNE, M., HAVE, P., MELOEN, R.H., MORGAN, D.O., SIMONE, F. de.

Texto en inglés. *J. gen. Virol.*, 70(3):639-645, 1989. AFRC Inst. Anim. Hlth, Ash Rd., Pirbright, Woking, Surrey GU24 0NF, UK.

Evidencia de por lo menos cuatro sitios antigénicos en el tipo O del aftovirus involucrados en la neutralización; identificación por sitios simples y múltiples en mutantes resistentes a anticuerpos monoclonales

Anticuerpos monoclonales producidos contra el tipo O del aftovirus fueron caracterizados en su reactividad con un panel de mutantes resistentes de sitio simple, las cuales poseían tres sitios antigénicos definidos. Cinco anticuerpos neutralizaron todas estas mutantes, pero al seleccionar más mutantes de sitio simple, con uno de estos anticuerpos fue posible definir un cuarto sitio involucrado en la neutralización del virus. Dos anticuerpos monoclonales aún neutralizaron estas mutantes y todas las mutantes resistentes de sitio múltiple. Una mutante resistente de sitio múltiple resistió a la neutralización en cada uno de los cuatro sitios antigénicos, pero aún fue neutralizada eficientemente por el suero de tipo O de bovinos convalecientes. Se discute la relación entre los sitios reconocidos por diferentes anticuerpos monoclonales producidos en diferentes laboratorios.

Evidence for at least four antigenic sites on type O foot-and-mouth disease virus involved in neutralization; identification by single and multiple site monoclonal antibody-resistant mutants

Neutralizing monoclonal antibodies raised against type O foot-and-mouth disease virus were characterized for reactivity with a panel of single site monoclonal antibody-resistant mutants which had defined three antigenic sites. Five antibodies neutralized all these mutants, but by selecting further single site mutants with one of these antibodies it was possible to define a fourth site involved in virus neutralization. Two monoclonal antibodies still neutralized these mutants and all multiple site resistant mutants. One multiple site resistant mutant was resistant to neutralization at each of four antigenic sites but was still efficiently neutralized by type O convalescent cattle sera. The relationship between sites recognized by different monoclonal antibodies generated in different laboratories is discussed.

PARRY, N.R., OULDRIDGE, E.J., BARNETT, P.V., CLARKE, B.E., FRANCIS, M.J., FOX, J.D., ROWLANDS, D.J., BROWN, F.

Texto en inglés. *J. gen. Virol.*, 70(11):2919-2930, 1989. Department of Virology, Wellcome Biotech. Ltd., Langley Court, Beckenham, Kent BR3 3BS, UK.

Perspectivas serológicas de vacunas antiaftosa de péptidos sintéticos

Anticuerpos para un péptido sintético correspondiente a la secuencia de aminoácidos 141 a 160 de la proteína VP1 del tipo O del aftovirus neutralizan una gama más amplia de aislados tipo O que el suero antivirión. Al extender este péptido en amino terminal se redujo el número de cepas neutralizadas por los sueros antipéptidos. Las reacciones con antisueros de péptidos representando secuencias nativas no contiguas mostraron que también fue posible aumentar el número de cepas efectivamente neutralizadas. Sustituciones seleccionadas de un único aminoácido en la posición 148 alteró marcadamente la especificidad neutralizante de los anticuerpos estimulados por los péptidos 141 a 160. En particular, un péptido con una sustitución L-S en esta posición produjo anticuerpos que neutralizaron igualmente un tipo O y un tipo A de virus, y cobayos inoculados con él fueron protegidos al desafío con cualquiera de los virus. Estudios para aislar variantes de virus resistentes a la neutralización con anticuerpos antipéptido indicaron que estas ocurrieron con baja frecuencia, y hubo alguna evidencia de que la resistencia puede ser parcialmente conferida por mutaciones fuera de la secuencia del péptido.

Serological prospects for peptide vaccines against foot-and-mouth disease virus

Antibodies to a synthetic peptide corresponding to the 141 to 160 amino acid sequence of the protein VP1 of type O foot-and-mouth disease virus (FMDV) neutralize a wider range of type O isolates than anti-virion serum. Extending this peptide at the amino terminus reduced the number of strains neutralized by the antipeptide sera. Reactions with antisera to peptides representing non-contiguous native sequences showed that it was also possible to increase the number of strains effectively neutralized. Selected substitutions of a single amino acid at position 148 markedly altered the neutralizing specificity of antibodies elicited by the 141 to 160 peptide. In particular, a peptide with an L-S substitution at this position induced antibodies which neutralized a type O and a type A virus equally, and guinea-pigs inoculated with it were protected from challenge with either virus. Attempts to isolate variant viruses resistant to neutralization with anti-peptide antibody indicated that these occurred at low frequency, and there was some evidence that resistance may be partially conferred by mutations outside the peptide sequence.

RWEYEMAMU, M.M., UMEHARA, O., GIORGI, W., MEDEIROS, R., LUCCA NETO, D., BALTAZAR, M.

Texto en inglés. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 8(3):747-764, 1989. Pfizer Int. Inc., Lab. Pfizer Ltda., Rodovia Pres. Dutra km 225, 07010 Guarulhos, São Paulo, Brasil.

Efecto del formol y de la etileneimina binaria (BEI) en la integridad del cápside del aftovirus

El tratamiento del virus aftoso con formol ha provocado una reducción estadísticamente significativa ($p > 0.05$) de la concentración de partículas 140S (del 26 al 72%) en cinco de las seis cepas sudamericanas de virus vacunal probadas. El formol también redujo la estabilidad del virus. Así, al cabo de 6 meses de almacenamiento a 4°C, la

Effect of formaldehyde and binary ethyleneimine (BEI) on the integrity of foot and mouth disease virus capsid

Formaldehyde treatment of foot and mouth disease (FMD) virus caused a statistically significant ($p > 0.05$) reduction in the concentration of 140S particles (26-72%) for 5 of the 6 South American vaccine virus strains tested. Formaldehyde also reduced the stability of the virus; after storage at 4°C for 6 months, there was a decay of

concentración de las partículas 140S había disminuido entre un 33 y un 85%. En cambio, para las muestras tratadas con etileneimina binaria (BEI), no hubo disminución significativa de las partículas 140S ni inmediatamente después de la inactivación ni después del almacenamiento. La eficacia de la inactivación del poder infectante por la BEI fue influenciada por la concentración del producto y por la temperatura. No se observó ninguna reducción significativa de las 140S en 24 horas a 36°C.

33-85% in the concentration of 140S particles. In contrast, samples treated with BEI did not undergo a significant reduction in 140S immediately after inactivation or after storage. The efficiency of infectivity inactivation by BEI was influenced by its concentration and temperature. No significant reduction in 140S was observed at 36°C in 24 hours.

RYAN, M.D., BELSHAM, G.J., KING, A.M.Q.

Texto en inglés, *Virology*, 173:35-45, 1989. A.F.R.C. Inst. Anim. Hlth, Pirbright Lab., Ash Road, Pirbright, Woking, GU24 0NF, England.

Especificidad de las interacciones sustrato-enzima en el procesamiento de la poliproteína del aftovirus

Una serie de transcripciones derivadas de plásmidos de ADNc de aftovirus con regiones del genoma definidas fueron expresadas en un sistema de lisado de reticulocitos de conejo. Los productos fueron analizados directamente o tras incubación con un extracto de células infectadas con aftovirus. El procesamiento por la proteinasa L en el sitio del corte L/1A ocurrió cuando la mayor parte de la proteína P1-2A estaba ausente. La sustitución de secuencias anteriores al sitio del corte de 2C/3A demostró que la proteinasa 3C también fue capaz de cortar en un sitio enteramente nuevo, aparentemente al nivel de los pares de aminoácido K-I. El corte en el sitio 2A/2B no solo fue independiente de las proteinasas L y 3C, sino que ocurrió cuando 2A y por lo menos cuatro aminoácidos 2B del terminal N estaban presentes. Por lo tanto, las actividades proteolíticas distintas responsables por los tres procesamientos primarios que originan los productos L, P1-2A, 2BC y P3 fueron altamente resistentes, tanto a la supresión o sustitución masiva de secuencias proteicas adyacentes a, o en el sitio del corte. Por el contrario, el procesamiento secundario *in trans* fue sensible a cambios en sitios lejanos. Por ejemplo, la remoción de las regiones del terminal C de los precursores P1-2A y 2BC

Specificity of enzyme-substrate interactions in foot-and-mouth disease virus polyprotein processing

A series of transcripts derived from FMDV cDNA plasmids containing defined regions of the genome were translated in a rabbit reticulocyte lysate system. The products were analyzed directly or following incubation with an FMDV-infected cell processing extract. Processing by the L proteinase at the L/1A cleavage site occurred when most of the P1-2A protein was absent. Substitution of sequences upstream of the 2C/3A cleavage site showed that the 3C proteinase was also able to cleave at an entirely novel cleavage site, apparently at K-I amino acids pairs. Cleavage at the 2A/2B site was not only independent of L and 3C proteinases, but was shown to occur when 2A and as few as four 2B N-terminal amino acids were present. Thus, the disparate proteolytic activities responsible for all three primary processing events that give rise to the products L, P1-2A, 2BC, and P3 were highly resistant either to major deletion or substitution of protein sequences adjacent to, or at, the site of cleavage. By contrast, secondary processing *in trans* was sensitive to changes at remote sites. For example, removal of the C-terminal regions of P1-2A and 2BC precursors impaired their ability to act as substrates for 3C proteinase activity. Processing

redujo su habilidad para actuar como sustratos para la actividad de la proteinasa 3C. El procesamiento de la P1-2A, especialmente del sitio 1D/2A de corte, fue intensificado por la inclusión de secuencias de la región 3D del genoma.

of P1-2A, particularly of the 1D/2A cleavage site, was enhanced by inclusion of sequences from the 3D region of the genome.

TORRE, J.C. de la, MARTINEZ-SALAS, E., DIEZ, J., DOMINGO, E.

Texto en inglés. *J. Virol.*, 63(1):59-63, 1989. Centro Biol. Molec., Consejo Superior Invest. Cient., Univ. Autónoma, Canto Blanco, 28049 Madrid, España.

Heterogenicidad celular extensiva durante una infección persistente con aftovirus

La coevolución de virus y de células huéspedes ocurrió en cultivos de células BHK-21 infectados persistentemente con aftovirus (J.C. de la Torre, E. Martínez-Salas, J. Díez, A. Villaverde, F. Gebauer, E. Rocha, M. Dávila y E. Domingo, *J. Virol.*, 62: 2050-2058, 1988). En este informe se presenta la evidencia de que una gran heterogenicidad fenotípica de las células fue generada en el curso de la persistencia. Se examinaron 248 clones celulares estables obtenidos a partir de los primeros y los últimos pases de cultivos portadores de aftovirus. Se distinguieron por lo menos seis fenotipos de células distintos con referencia a la morfología celular, resistencia al aftovirus cepa C-S8cl y características de crecimiento celular. No se detectó aftovirus infeccioso o ARN viral en los clones celulares de las variantes, lo que sugiere que los fenotipos alterados fueron causados por modificaciones celulares heredadas, seleccionados en el curso de la persistencia. Por lo tanto, el sistema portador BHK-21-aftovirus puede ser descrito como una interacción dinámica entre una población heterogénea de virus en evolución y múltiples variantes celulares. Sugierimos que la heterogenicidad celular confiere una ventaja selectiva para la sobrevivencia a largo plazo de virus y células mediante la provisión de una población celular con una gama de respuestas hacia el aftovirus.

Extensive cell heterogeneity during persistent infection with foot-and-mouth disease virus

Coevolution of viruses and the host cells occurred in BHK-21 cell cultures persistently infected with foot-and-mouth disease virus (FMDV) (J.C. de la Torre, E. Martínez-Salas, J. Díez, A. Villaverde, F. Gebauer, E. Rocha, M. Dávila, and E. Domingo, *J. Virol.*, 62:2050-2058, 1988). In the present report we provide evidence of an extreme phenotypic heterogeneity of the cells, which was generated in the course of persistence. A total of 248 stable cell clones isolated from FMDV carrier cultures at early or late passages were analyzed. At least six distinct cell phenotypes were distinguished with regard to cell morphology, resistance to FMDV strain C-S8cl, and cell growth characteristics. No infectious FMDV or viral RNA was detected in variant cell clones, suggesting that the altered phenotypes were caused by inheritable cell modifications, selected in the course of persistence. Thus, the FMDV-BHK-21 carrier cell system must be described as a dynamic interaction between an evolving heterogeneous population of virus and multiple cell variants. We suggest that cell heterogeneity confers a selective advantage for long-term virus cell survival by providing the cell population with a range of responses toward FMDV.

VAN MAANEN, C., TERPSTRA, C.

Texto en inglés. *J. Immunol. Meth.*, 124:111-119, 1989. Central Vet. Inst., Dep. Virol., P.O.Box 365, 8200 AJ Lelystad, The Netherlands.

Comparación de las pruebas de ELISA "sandwich" de bloqueo de fase líquida y de seroneutralización para evaluar la inmunidad y las pruebas de potencia de vacunas antiaftosa

Se examinaron sueros de bovinos vacunados contra cepas del alftovirus A10 Holanda, O1 BFS, o C1 Detmold en una prueba de seroneutralización (SN) y una prueba de ELISA "sandwich" de bloqueo de fase sólida (LBE). Los títulos fueron comparados con los resultados de las pruebas de desafío por vía intradermolingual. Los resultados de las pruebas de LBE fueron mucho más reproducibles ($P < 0.005$) que los de SN. La correlación de coeficientes entre SN y LBE fue 0,91 para las cepas A10 Holanda y O1 BFS, y 0,82 para la cepa O1 Detmold ($P < 0,0005$). El coeficiente de regresión para la cepa A10 Holanda fue 0,80, para la cepa O1 BFS el valor fue de 0,87, y para la cepa C1 Detmold fue de 0,64. En el análisis probit, los títulos de protección de 95% de los bovinos contra el desafío con la cepa homóloga fueron determinados por SN y LBE. En la prueba de SN el 95% de los niveles de protección para las cepas A10 Holanda fueron $\geq 0,84$, para O1 BFS $\geq 1,59$, y para C1 Detmold $\geq 0,83$. Con la prueba de LBE, los títulos fueron $\geq 1,28$, $\geq 1,71$ y $\geq 1,74$, respectivamente. Debido a que las pruebas de SN y LBE están muy correlacionadas, y la de LBE es más reproducible, ésta probablemente pronostica más protección con un mayor grado de confianza que la prueba de SN.

Comparison of a liquid-phase blocking sandwich ELISA and a serum neutralization test to evaluate immunity in potency tests of foot-and-mouth disease vaccines

Sera from cattle vaccinated against either foot-and-mouth disease virus (FMDV) strains A10 Holland, O1 BFS, or C1 Detmold were tested in a serum neutralization test (SNT) and a liquid-phase blocking sandwich ELISA (LBE), and the titers were compared with the results of intradermolingual challenge tests. The LBE test results were significantly more reproducible ($P < 0.005$) than the SNT results. The correlation coefficients between SNT and LBE were 0.91 for FMDV strains A10 Holland and O1 BFS, and 0.82 for FMDV strain C1 Detmold ($P < 0.0005$). The regression coefficient for strain A10 Holland was 0.80, for strain O1 BFS the value was 0.87, and for strain C1 Detmold it was 0.64. In probit analysis, titers at which 95% of the cattle were protected against challenge with the homologous strain were determined for the SNT and the LBE. In the SNT the 95% protection levels for strains A10 Holland were ≥ 0.84 , for O1 BFS ≥ 1.59 , and for C1 Detmold ≥ 0.83 . In the LBE they were ≥ 1.28 , ≥ 1.71 , and ≥ 1.74 , respectively. Because the SNT and the LBE are highly significant correlated, and the LBE is more reproducible, the LBE is likely to predict protection more reliably than the SNT.

VILLINGER, F., MUELLER, H.K., BRUCKNER, L., ACKERMANN, M., KIHLM, U.

Texto en inglés. *Vet. Microbiol.*, 20(3):235-246, 1989. Eidgenoessisches Vakzine-Inst., Hagenaustrasse 74, 4025 Basel, Switzerland.

Anticuerpos al antígeno asociado a la infección por aftovirus (VIA): uso de una proteína VIA de bioingeniería como antígeno en una prueba de ELISA

Se desarrolló una prueba de inmunoensayo (ELISA) para detectar anticuerpos al antígeno asociado a la infección por aftovirus (VIA) (polimerasa del ARN viral) en sueros de bovinos, usando una proteína de bioingeniería del antígeno VIA

Antibodies to foot-and-mouth disease virus infection associated (VIA) antigen: use of a bioengineered VIA protein as antigen in an ELISA

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect antibodies to foot-and-mouth disease (FMD) virus infection associated (VIA) antigen (viral RNA polymerase) in cattle sera, was developed using a bioengineered VIA (BioVIA)

(BioVIA). Esta prueba de ELISA, con una polimerasa de ARN viral purificada de cultivos celulares infectados como antígeno, fue más sensible cuando comparada con la prueba clásica de inmunodifusión. Sin embargo, dependiendo de la población bovina examinada, fueron detectados sueros con anticuerpos a la polimerasa ARN viral, probablemente debido a la infección con otros picornavirus. A pesar de estas observaciones, la prueba de ELISA usando BioVIA presentó una respuesta rápida referente a la circulación, o no, del aftovirus en un determinado rebaño bovino. La principal ventaja de esta prueba de ELISA es su absoluta seguridad, dado que en ningún momento de la producción del antígeno, el aftovirus infeccioso o no infeccioso estuvo involucrado. Así, la prueba puede ser realizada bajo las condiciones normales de laboratorio y no son necesarias unidades de aislamiento, como ocurre con la prueba de inmunodifusión.

protein antigen. Compared with the classical immunodiffusion test, with viral RNA polymerase purified from infected cell cultures as antigen, this ELISA was more sensitive. However, depending on the cattle population examined, sera with antibodies to viral RNA polymerase, probably due to infection with other picornaviruses, were detected. Despite these observations, the ELISA using BioVIA provided a rapid answer as to whether or not FMD virus circulated in a given herd of cattle. The main advantage of this ELISA is its absolute safety, since in no step of the antigen production was infectious or uninfected FMD virus involved. The test can therefore be performed under normal laboratory conditions and no isolation units are needed as they are for the immunodiffusion test.

WIESMÜLLER, K.H., JUNG, G., HESS, G.

Texto en inglés. *Vaccine*, 7(1):29-33, 1989. Inst. Org. Chem., Univ of Tübingen, D7400 Tübingen, German Federal Republic.

Nueva vacuna sintética de bajo peso molecular conteniendo un activador potente de células B y macrófagos

La mayoría de las vacunas de péptidos sintéticos hasta ahora descritas son eficaces solo cuando combinadas con proteínas y adyuvante de Freund. El trabajo describe una nueva vacuna que consiste solo de un péptido sintético que contiene un activador sintético de células B y macrófagos, unido covalentemente a un epítipo anfifílico helicoidal alfa de célula T. El bajo peso molecular de la vacuna de 3,4 kDa, desarrollado contra el aftovirus está compuesto de un VP1 sintético (135-154) con una secuencia homóloga a una proteína de aftovirus y el adyuvante tripalmitoil-S-gliceril-cisteinilserilserina (P₃ CSS). El P₃ CSS es un sintético análogo a la parte del terminal N de la lipoproteína de bacterias Gram-negativas. El determinante antigénico VP1 (135-154) es una hélice alfa como se muestra por dicroísmo circular. El

Novel low-molecular-weight synthetic vaccine against foot-and-mouth disease containing a potent B-cell and macrophage activator

Most synthetic peptide vaccines described to date are effective only in combination with proteins and Freund's adjuvant. The work describes a novel completely synthetic virus peptide vaccine, which consists of a synthetic activator of B cells and macrophages, covalently linked to an amphiphilic α -helical T-cell epitope. The low-molecular-weight vaccine of 3.4 kDa developed against foot-and-mouth disease virus (FMDV) is composed of a synthetic VP1 (135-154) with a sequence homologous to an FMDV protein and the adjuvant tripalmitoyl-S-glycerol-cysteinylserine (P₃ CSS). P₃ CSS is the synthetic analogue of the N-terminal part of the lipoprotein from Gram-negative bacteria. The antigenic determinant VP1 (135-154) is an α -helix as shown by circular dichroism. The resulting novel type of vaccine

nuevo tipo de vacuna antiaftosa VP1 P₃PCSS (135-154) resultante, produce una protección sólida y de larga duración contra la fiebre aftosa, y anticuerpos serotipo específico virus-neutralizantes en cobayos después de una única aplicación sin ningún adyuvante adicional o medio. Al contrario de otros conjugados de ácido oleoso simple, este nuevo tipo de vacuna contiene un adyuvante con alta afinidad tanto a los linfocitos B como T.

P₃CSS-FMD-VP1 (135-154) induces a long-lasting high protection against foot-and-mouth disease and serotype-specific virus-neutralizing antibodies in guinea-pigs after a single administration without any additional adjuvant or carrier. In contrast to other simple fatty acid conjugates this new type of vaccine contains a built-in adjuvant with high affinity to both B and T lymphocytes.

BIBLIOGRAFIA SOBRE ENFERMEDADES VESICULARES

VESICULAR DISEASES BIBLIOGRAPHY

ACKERMANN, M., MÜLLER, H.K., BRUCKNER, L., KIHM, U.

(Vacunación contra la fiebre aftosa en Suiza: II. Problemas referentes a la estabilidad de las vacunas. Vaccination against foot-and-mouth disease in Switzerland: II. Problems concerning the stability of the vaccines.) Texto en alemán. *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, 131:389-395, 1989. Eidg. Vakzine-Institute, Postfach, Ch-4025 Basel, Switzerland.

AHL, R.

(Conocimiento de brotes de fiebre aftosa en Europa. Knowledge from outbreaks of foot and mouth disease in Europe.) Texto en alemán. In: *Tagung der Fachgruppe Tierseuchenrech. Aktuelles zur Verhütung und Bekämpfung Übertragbarer Tierkrankheiten*. Hannover, 3/4 Nov. 1987. Deutsche Vet. Gesellschaft, 1988. p.1-10. In: *Index Vet.*, 57(12):49, 1989. Frankfurter Strasse, 6300 Giessen, German Federal Republic.

AJLOUNI, A.Q.

(Jordanian.) Jordan. In: *Foot and mouth disease*. 17th Conf. OIE FMD Commission. Paris, 1-3 October 1986. Paris, France, OIE, 1987. p.87-88. In: *Index Vet.*, 58(6):70, 1990.

AJLOUNI, A.Q.

(Estrategias para el control de la fiebre aftosa basadas en sistemas epidemiológicos y producción animal.) FMD control strategies based on epidemiological and animal production systems. In: *Foot and mouth disease*. 17th Conf. OIE FMD Commission. Paris, 1-3 October 1986. Paris, France, OIE, 1987. p.311. In: *Index Vet.*, 58(6):71, 1990.

ANON.

(Moléculas proporcionales para fiebre aftosa.) Shapely molecules for foot-and-mouth. *Genetic Eng. Biotech. Monitor*, 26:51-52, 1989.

ANON.

(Situación de la fiebre aftosa en Europa durante 1987-1988.) FMD position in Europe during 1987-1988. In: *FAO. Rep. Sess. Res. Gp. Stand. Tech. Comm. Eur. Comm. Control FMD*. Rome, 9-12 May 1989. p.32-38.

ANON.

(Situación de la fiebre aftosa en otras regiones.) FMD position in other regions. In: *FAO. Rep. Sess. Res. Gp. Stand. Tech. Comm. Eur. Comm. Control FMD*. Rome, 9-12 May 1989. p.39-46.

ANON.

(Profilaxis en Europa: política de vacunación.) Prophylaxis in Europe: vaccination policy. In: *FAO. Rep. Sess. Res. Gp. Stand. Tech. Comm. Eur. Comm. Control FMD*. Rome, 9-12 May 1989. p.47-60.

ANON.

(Profilaxis en Europa: planes nacionales de contingencia para acción de emergencia a ser tomada en caso de un brote de fiebre aftosa.) Prophylaxis in Europe: national contingency plans for emergency action to be taken in case of an FMD outbreak. In: *FAO. Rep. Sess. Res. Gp. Stand. Tech. Comm. Eur. Comm. Control FMD*. Rome, 9-12 May 1989. p.61-70.

ANON.

(Guías para sacrificio —rifle sanitario— total o parcial en fiebre aftosa y métodos de eliminación.) Guidelines for total or partial stamping out of foot-and-mouth disease (FMD) and disposal methods. In: **FAO. Rep. Sess. Res. Gp. Stand. Tech. Comm. Eur. Comm. Control FMD**. Rome, 9-12 May 1989. p.71-74.

ANON.

(Planos de contingencia: aspectos de laboratorio.) Contingency plans: laboratory aspects. In: **FAO. Rep. Sess. Res. Gp. Stand. Tech. Comm. Eur. Comm. Control FMD**. Rome, 9-12 May 1989. p.75-76.

ANON.

(Análisis de costo/beneficio en la política de vacunación en Europa: resultados/conclusiones.) Cost-benefit analysis on vaccination policy in Europe: results/conclusions. In: **FAO. Rep. Sess. Res. Gp. Stand. Tech. Comm. Eur. Comm. Control FMD**. Rome, 9-12 May 1989. p.77-83.

ANON.

(Campañas de vacunación antiaftosa en el sudeste de Europa —1987-1988.) Foot-and-mouth disease vaccination campaigns in southeastern Europe —1987-1988. In: **FAO. Rep. Sess. Res. Gp. Stand. Tech. Comm. Eur. Comm. Control FMD**. Rome, 9-12 May 1989. p.85-97a.

ANON.

(Evaluación de la Zona Tampón Europea.) Survey of the European Buffer Zone. In: **FAO. Rep. Sess. Res. Gp. Stand. Tech. Comm. Eur. Comm. Control FMD**. Rome, 9-12 May 1989. p.98-99.

ANON.

(Actividades del grupo de investigación durante 1987-1988). Activities of the Research Group during 1987-1988. In: **FAO. Rep. Sess. Res. Gp. Stand. Tech. Comm. Eur. Comm. Control FMD**. Rome, 9-12 May 1989. p.100-109.

ANON.

(La evolución de los sistemas agrícolas y sus implicaciones para el control de la fiebre aftosa.) The evolution of farming systems and their implications for FMD control. In: **FAO. Rep. Sess. Res. Gp. Stand. Tech. Comm. Eur. Comm. Control FMD**. Rome, 9-12 May 1989. p.110-123.

ANON.

(Estándares básicos para la aprobación y control de plantas utilizadas para la eliminación de carcasas enfermas. Procedimientos en la República Federal de Alemania.) Basic standards for the approval and control of rendering plants in use for the disposal of diseased carcasses. In: **FAO. Rep. Sess. Res. Gp. Stand. Tech. Comm. Eur. Comm. Control FMD**. Rome, 9-12 May 1989. p.124-128.

ARGOS, P.

(Una posible homología entre la proteína interna del virus de inmunodeficiencia p24 y la proteína VP2 de la cobertura del picornavirus: predicción de sitios antigénicos de virus de inmunodeficiencia humana p24.) A possible homology between immunodeficiency virus p24 core protein and picornaviral VP2 coat protein: predication of HIV p24 antigenic sites. **EMBO. J.**, 8(3):779-785, 1989. In: **Virol. & Aids Abstr.**, 22(11):8040-V22, 1989. European Mol. Biol. Lab., Postfach 10 22 09, Meyerhofstr. 1, 6900 Heidelberg, FGR.

ATWELL, J.K.

(EE.UU.) USA. In: **Foot and mouth disease**. 17th Conf. OIE FMD Commission. Paris, 1-3 October 1986. Paris, France, OIE, 1987. p.71. In: **Index Vet.**, 58(6):70, 1990.

BANUMATHI, N., RAO, B.U.

(Una nota sobre cristalización del aftovirus.) A note on the crystalization of foot-and-mouth disease virus. **Curr. Sci.**, 58(9):495-496, 1989. In: **Virol. & Aids Abstr.**, 23(8):5911-V23, 1990. Indian Vet. Res. Inst., Bangalore Campus, Bangalore 560 024, India.

BARMAN, M.N., BORO, B.R.

(Reacción en cerdos a la vacuna antiaftosa con adyuvante DEAE-dextrano.) Reaction to DEAE-dextran adjuvant foot and mouth disease virus vaccine in swine. **Indian J. Vet. Pathol.**, 12:7-12, 1988. In: **Vet. Bull.**, 60(4):2474, 1990. Dep. Microbiol., Coll. Vet. Sci., Khanapara, Guwahati 781022, Assam, India.

BARSOUM, G.W.

(Egipto.) Egypt. In: **Foot and mouth disease**. 17th Conf. OIE FMD Commission. Paris, 1-3 October 1986. Paris, France, OIE, 1987. p.33-34. In: **Index Vet.**, 58(6):70, 1990.

BAXT, B., MORGAN, D.O.

(Naturaleza de la interacción entre el aftovirus y cultivos celulares.) Nature of the interaction between foot-and-mouth disease virus and cultured cells. In: **Virus attachment and entry into cells**. Ed. R.L. Crowell, R. Lonberg-Holm. Washington, D.C., USA, American Society Microbiology, 1986. p.126-137. In: **Index Vet.**, 57(7):6, 1989.

BELLANI, L.

(Situación de la fiebre aftosa en Italia.) Status of foot and mouth disease in Italy. **Dis. Inf., Off. int. Epiz.**, 1(2):5, 1988. In: **Index Vet.**, 57(6):56, 1989.

BELLANI, L., GIULIANO, S., GUARDO, G. di.

(Actuales profilaxis y estrategias de control de la fiebre aftosa.) Current FMD prophylaxis and control strategies. In: **Foot and mouth disease**. 17th Conf. OIE FMD Commission. Paris, 1-3 October 1986. Paris, France, OIE, 1987. p.331-338. In: **Index Vet.**, 58(6):71, 1990.

BELWAL, L.M., SRINIVASAN, V.A., KANT, R.

(Diferenciación de cepas de aftovirus tipo Asia 1 de India.) Strain differentiation of foot and mouth disease virus type Asia 1 isolates of Indian origin. **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.**, 8(3):771-778, 1989. Indian Immunologicals, 11-4-657 Lakdi-ka-pul, Hyderabad 500 004, India.

BENGELSDORFF, H.J.

(Prueba de eficacia de vacunas antiaftosa: relaciones entre los resultados de pruebas de infección y los títulos correspondientes de neutralización de bovinos vacunados. Testing the efficacy of foot and mouth disease vaccines: relationships between test infection results and corresponding neutralization titres of vaccinated cattle.) Texto en alemán. **Berliner Münchener Tierärztliche Wochenschrift**, 102(6):193-198, 1989. In: **Vet. Bull.**, 59(11):6375, 1989. Behringwerke AG, Postfach 1140, 3550 Marburg, German Federal Republic.

BERGER, H.G., TESAR, M., STRAUB, O.C. *et al.*

(Antígenos asociados a la infección por aftovirus en bovinos.) FMDV infection-associated antigens in cattle. Contribution of molecular biology to veterinary virology. 1st Cong. Eur. Soc. Vet. Virol., Liege, Belgium, 1989. In: **FMD Bull.**, 27(3):89/59, 1989. Federal Research Centre for Virus Diseases of Animals, Tübingen, Federal Republic of Germany.

BOIKO, A.A., KRUGLIKOV, B.A.

(El conjunto de medidas contra la fiebre aftosa como un modelo eficaz para controlar y erradicar otras enfermedades infecciosas de animales. The complex of measures against foot and mouth disease as an effective model for the control and eradication of other infectious diseases of animals.) Texto en ruso. **Veterinariya**, Moscow, 1:35-38, 1989. In: **Vet. Bull.**, 59(10):5810, 1989. Vsesoyuznyi Institut Biologicheskoi Promyshlennosti, Moscow, USSR.

BOIKO, A.A., KRUGLIKOV, B.A., SHCHENEV, A.I.

(Organización de medidas contra la fiebre aftosa en zonas de migración de virus. Organization of anti-foot-and-mouth disease measures in migration zone of virus.) Texto en ruso. **Veterinariya**, 1:33-34, 1987. In: **Virol. & Aids Abstr.**, 22(11):8717-V22, 1989.

BOLWELL, C., BROWN, A.L., BARNETT, P.V., CAMPBELL, R.O., CLARKE, B.E., PARRY, N.R., OULDRIDGE, E.J., BROWN, F., ROWLANDS, D.J.

(Selección de células huéspedes de variantes antigénicas de aftovirus.) Host cell selection of antigenic variants of foot-and-mouth disease virus. **J. gen. Virol.**, 70(1):45-57, 1989. Wellcome Biotech. Ltd., Langley Court, Beckenham, Kent BR3 3BS, UK.

BRAUN, M., SIGAL, L., MUNDO, S. *et al.*

Respuesta inmunitaria celular contra el aftovirus en bovinos. Efecto de la vacunación. (Cellular immune response against foot-and-mouth disease virus in cattle. Effect of vaccination.) **Medicina, B.Aires**, 49:216-220, 1989. In: **FMD Bull.**, 27(3):89/64, 1989. Cátedra de Inmunología, Fac. Ciencias Vet., Univ. de Buenos Aires, Argentina.

BROWN, A.L., CAMPBELL, R.O., CLARKE, B.E.

(La secuencia nucleótida de la región que codifica la proteína estructural del aftovirus serotipo SAT3.) The nucleotide sequence of structural-protein-coding region of foot-and-mouth disease virus serotype SAT3. **Gene**, 75(2):225-233, 1989. In: **Vet. Bull.**, 59(9):5116, 1989. Dep. Virol., Wellcome Biotech. Ltd., Beckenham, Kent BR3 3BS, UK.

BROWN, C.C., OLANDER, H.J., MEYER, R.F.

(Patogenesis de la fiebre aftosa en cobayos usando hibridización *in situ*.) Pathogenesis of foot-and-mouth disease in guinea pigs using "in situ" hybridization. **Proc. Ann. Meet. USA Hlth Assoc.**, 93: 321-323, 1989.

BROWN, F.

(Hacia una vacuna molecular para la fiebre aftosa.) Towards a molecular vaccine for foot-and-mouth disease. In: **Molecular aspects of picornavirus infection and detection**. Ed. B.L. Semler, E. Ehrenfeld. Washington, D.C., USA, American Society for Microbiology, 1989. p.179-192. In: **Virol. & Aids Abstr.**, 22(8):6069-V22, 1989. Dep. Virol., Wellcome Biotech. Ltd., Langley Court, Beckenham, Kent BR3 3BS, UK.

BROWN, F.

(Virus de la fiebre aftosa.) Foot-and-mouth disease virus. In: **Synthetic vaccines**. Ed. R. Arnon. Boca Raton, USA, CRC Press, 1987. V.II. p.65-67. In: **Index Vet.**, 57(8):38, 1989.

BROWN, F.

(Péptidos sintéticos como inmunógenos.) Synthetic peptides as immunogens. In: **Applied virology research. New vaccines and chemotherapy**. Ed. E. Kurstak, R.G. Marusyk, F.A. Murphy, M.H.V. van Regenmortel. New York, NY 10013, USA, Plenum Publishing Corporation, 1988. V.1. p.93-106. In: **Index Vet.**, 58(6):16, 1990. Wellcome Biotech. Ltd., Beckenham, Kent BR3 3BS, UK.

BROWN, F.

(Determinantes de células T auxiliares en un modelo de vacuna.) Helper T-cell determinants in vaccine design. **J. Autoimmun.**, 2(suppl.):251-255, 1989. In: **Virol. & Aids Abstr.**, 22(11):8389-V22, 1989. Dep. Virol., Wellcome Biotech. Ltd., Langley Court, Beckenham, Kent BR3 3BS, UK.

BROWN, F.

(El desarrollo de vacunas químicamente sintetizadas.) The development of chemically synthesized vaccines. In: **Vaccine biotechnology**. Ed. J.L. Bittle, F.L. Murphy. San Diego, CA, Academic Press, 1989. p.173-193. In: **Virol. & Aids Abstr.**, 23(9):6889-V23, 1990. Dep. Virol., Wellcome Biotech. Ltd., Beckenham, Kent BR3 3BS, UK.

BROWN, F.

(La próxima generación de vacunas antiaftosa.) The next generation of foot-and-mouth disease vaccines. In: **Synthetic peptides. Approaches of biological problems**. Proceedings of a Glaxo-UCLA Colloquium held at Park City, Utah, January 31-February 4, 1988. Ed. J.P. Tam, E.T. Kaiser. In: UCLA Symp. on Molec. and Cell. Biol. New York, NY, Alan R. Liss, Inc., 1989. V.86. p.127-142. In: **Index Vet.**, 58(6):71, 1990. Wellcome Biotech. Ltd., Beckenham, Kent BR3 3BS, UK.

BUTCHAIHAH, G., RAO, B.U.

(Líneas celulares de hibridomas que segregan anticuerpos monoclonales del aftovirus tipo Asia-1.) Hybridoma cell lines secreting monoclonal antibodies to foot-and-mouth disease virus type Asia-1. **Acta Virol.**, 33(2):121-130, 1989. Indian Vet. Res. Inst., Bangalore 560 024, India.

CARRILLO, E.C., ROJAS, E.R., CAVALLARO, L., SCHIAPPACAS, M., CAMPOS, R.

(Modificación del aftovirus después de pasajes seriados en presencia de sueros policlonales antivirales.) Modification of foot-and-mouth disease virus after serial passages in the presence of antiviral polyclonal sera. **Virology**, 171(2):599-601, 1989. Dr. R.Campos, Cátedra Microbiol., Univ. de Buenos Aires, Junín 956, 1113 Cap. Fed., Argentina.

CLERCQ, K. de, KOENEN, F., STROBBE, R., DEBECQ, J.

(Vacunación simultánea de lechones contra la fiebre aftosa y la peste porcina clásica.) Simultaneous vaccination of piglets against foot-and-mouth disease and classical swine fever. **Vet. Microbiol.**, 20(3): 215-221, 1989. Nat. Inst. Vet. Res., Groeselenberg 99, B-1180 Brussels, Belgium.

CLERCQ, K. de, STROBBE, R., OPDENBOSCH, E. van, WELLEMANS, G., THEYS, J., DEBECQ, J.

(La respuesta serológica a la vacunación antiaftosa no es afectada por infecciones simultáneas de vacunaciones de rinotraqueitis bovina/adenovirus/parainfluenza 3.) The serological response to foot-and-mouth disease vaccination is not affected by simultaneous infectious bovine rhinotracheitis/adenovirus/parainfluenza 3 vaccination. **Arch. Exper. Veterinarmed.**, 43(3):409-413, 1989. In: **Vet. Bull.**, 60(3):1527, 1990. Nat. Inst., Vet. Res., Groeselenberg 99, B-1180 Brussels, Belgium.

- CLERCQ, K. de, STROBBE, R., VANOPDENBOSCH, E., DEBECQ, H., THEYS, H.
(Evolución de anticuerpos maternos contra el aftovirus y su influencia en la vacunación de terneros. Evolution of maternal antibodies to foot and mouth disease virus and their influence on vaccination in calves.) Texto en francés. *Ann. Méd. Vét.*, 133(7):599-607, 1989. In: *Vet. Bull.*, 60(6):3905, 1990. INRV, Groeselenberg 99, B-1180, Bruxelles, Belgium.
- COLLEN, T., PULLEN, L., DOEL, T.R.
(Inducción de anticuerpos de células T dependientes contra el aftovirus en ratones.) T cell-dependent induction of antibody against foot-and-mouth disease virus in a mouse model. *J. gen. Virol.*, 70(2):395-403, 1989. AFRC Inst. Anim. Hlth, Vaccine Res. Lab., Ash Rd., Pirbright, Woking, Surrey GU24 0NF, UK.
- COUDERT, M., FEDIDA, M., FEDIDA, D.
(Complicaciones tras vacunación contra la fiebre aftosa: el papel de la secuencia de vacunación. Complications following vaccination against foot and mouth disease: role of the vaccination sequence.) Texto en francés. *Sci. Vét. Méd. Comp.*, 90(4):315-327, 1988. In: *Index Vet.*, 57(6):56, 1989.
- CULLEN, R.G.
(Irlanda.) Ireland. In: *Foot and mouth disease*. 17th Conf. OIE FMD Commission. Paris, 1-3 October 1986. Paris, France, OIE, 1987. p.96. In: *Index Vet.*, 58(6):70, 1990.
- DAOUD, A.
(Egipto. Producción de vacuna antiaftosa y actividades de investigación.) Egypt. FMD vaccine production & research activities. In: *Foot and mouth disease*. 17th Conf. OIE FMD Commission. Paris, 1-3 October 1986. Paris, France, OIE, 1987. p.35-36. In: *Index Vet.*, 58(6):70, 1990.
- DEBASTE, H.
Zambia. In: *Foot and mouth disease*. 17th Conf. OIE FMD Commission. Paris, 1-3 October 1986. Paris, France, OIE, 1987. p.50-52. In: *Index Vet.*, 58(6):70, 1990. P.O.Box 61044, Livingstone, Zambia.
- DEVANEY, M.A.
(Nuevas propuestas de vacunas de ingeniería genética para animales.) New approaches to animal vaccines utilizing genetic engineering. *CRC Crit. Rev. Microbiol.*, 15(3):269-270, 1988. In: *Virol. & Aids Abstr.*, 23(2):1306-V23, 1990. Plum Island Anim. Dis. Center, Greenport, NY 11944, USA.
- DIJKHUIZEN, A.A.
(Evaluación epidemiológica y económica de las estrategias de control de la fiebre aftosa en Holanda.) Epidemiological and economic evaluation of foot-and-mouth disease control strategies in the Netherlands. *Netherlands J. Agric. Sci.*, 37(1):1-12, 1989. In: *Vet. Bull.*, 60(3):1529, 1990. Dep. Farm Management, Agric. Univ., P.O.Box 8130, 6700 EW Wageningen, Netherlands.
- DIMITRIADES, I., KONDROKOUKI, E.
(Producción y uso de antígeno VIA para la detección de bovinos afectados por fiebre aftosa. Production and use VIA-antigen for detection of FMD-infected cattle.) Texto en alemán. *Deltion tes Ellenikes Kteniatrikes Etaireias*, 39(4):288-298, 1988. In: *Index Vet.*, 57(11):36, 1989.

DOBBELAAR, M.J.

(Holanda.) Netherlands. In: **Foot and mouth disease**. 17th Conf. OIE FMD Commission. Paris, 1-3 October 1986. Paris, France, OIE, 1987. p.107-113, In: **Index Vet.**, 58(6):70, 1990.

DONALDSON, A.I.

(Desarrollo y uso de modelos para pronosticar la diseminación por el aire de la fiebre aftosa.) Development and use of models for forecasting the airborne spread of foot-and-mouth disease. **J. Royal Agric. Soc., England**, 149:184-194, 1988. In: **Index Vet.**, 57(3):41, 1989. AFRC Inst. Anim. Hlth, Pirbright, Surrey, UK.

EL-HMOUD, M.

(Fiebre aftosa tipo O en Jordania.) Foot and mouth disease (FMD) type O in Jordan. **Dis. Inf., Off. int. Epiz.**, 1(3):9, 1988. In: **Index Vet.**, 57(6):56, 1989.

ERASMUS, J.M.

(Estrategias de control de la fiebre aftosa basadas en sistemas epidemiológicos y producción animal.) FMD control strategies based on epidemiological and animal production systems. In: **Foot and mouth disease**. 17th Conf. OIE FMD Commission. Paris, 1-3 October 1986. Paris, France, OIE, 1987. p.267-269. In: **Index Vet.**, 58(6):70, 1990.

FERRARI, A., MODA, G.

(Eficacia de la campaña de vacunación de 1986-1987 contra la epidemia de fiebre aftosa. Efficacy of the 1986-87 vaccination campaign against foot and mouth disease epidemic.) Texto en italiano. **Obiettivi e Documenti Veterinari**, 10(2):23-25, 1989. In: **Index Vet.**, 57(6):56, 1989.

FERRIS, N.P., CONDY, J.B., BARNETT, I.T.R., ARMSTRONG, R.M.

(Infección experimental de *Taurotragus oryx*, *Ozanna grandicomis* y *Syncerus caffer* con aftovirus.) Experimental infection of eland (*Taurotragus oryx*), sable antelope (*Ozanna grandicomis*) and buffalo (*Syncerus caffer*) with foot-and-mouth disease virus. **J. comp. Path.**, 101:307-316, 1989. Inst. Anim. Hlth, Pirbright Lab., Ash Rd., Pirbright, Woking, Surrey GU24 0NF, UK.

FLORES, M.

(España.) Spain. In: **Foot and mouth disease**. 17th Conf. OIE FMD Commission. Paris, 1-3 October 1986. Paris, France, OIE, 1987. p.114-121. In: **Index Vet.**, 58(6):70, 1990.

FORMAN, A.J.

(Una perspectiva para la investigación de la fiebre aftosa en Australia.) An Australian perspective for foot-and-mouth disease research. **Australian Vet. J.**, 66(12):409-410, 1989. In: **Index Vet.**, 58(7):44, 1990.

FOX, G., PARRY, N.R., BARNETT, P.V., MCGINN, B., ROWLANDS, D.J., BROWN, F.

(El sitio de unión celular en el aftovirus incluye la secuencia del aminoácido RGD —ácido argimínico-glicina-aspartico.) The cell attachment site on foot-and-mouth disease virus includes the amino acid sequence RGD (arginine-glycine-aspartic acid). **J. gen. Virol.**, 70(3):625-637, 1989. Wellcome Biotech. Ltd., Ash Rd., Pirbright, Woking, Surrey GU24 0NQ, UK.

GARMENDIA, A.E., BOREA, M.V., MORGAN, D.O., BAXT, B.

(Análisis de idiotipos neutralizantes del aftovirus de bovinos y porcinos inmunizados con sondas de anticuerpos anti-idiotipo de murino.) Analysis of foot-and-mouth disease virus-neutralizing idiotypes from immune bovine and swine with anti-murine idiotypic antibody probes. *J. Immunol.*, 143(9): 3015-3019, 1989. Dr. B.Baxt, Molec. Biol. Lab., USDA, ARS, Plum Island Animal Disease Center, P.O.Box 848, Greenport, NY 11944, USA.

GASCHÜTZ, S.

(Respuesta inmunitaria humoral de bovinos inoculados con diferentes cantidades de vacunaciones contra la fiebre aftosa: un estudio de campo. The humoral immune response of cattle given different numbers of vaccinations against foot and mouth disease: a field study.) *Die humorale Immunantwort von unterschiedlich häufig geimpften Rindern: eine Feldstudie.* Freie Univ. Berlin. German Federal Republic, 1988. p.169. Tesis. In: *Index Vet.*, 57(1):49, 1989.

GOEL, Y.P.

(Una nota sobre un brote de fiebre aftosa en un rebaño organizado.) A note on an outbreak of foot and mouth disease in an organised herd. *Indian J. Comp. Microbiol. Immunol. Infec. Dis.*, 9(2):91-93, 1988. In: *Index Vet.*, 58(8):40, 1990.

GOIC M., R.

La fiebre aftosa en América del Sur. (Foot and mouth disease in South America.) *Avances Ciencias Vet.*, 4(1):16-23, 1989. In: *Index Vet.*, 58(6):70, 1990.

GONZALEZ ROSAS, R., RIVERA SALAZAR, A.

(Estrategia de prevención de la fiebre aftosa y actividades en los Andes-Chile.) Foot-and-mouth disease preventive strategy and activities in the Andes mountain chains-Chile. *Agric. Livest. Serv., Livestock Division, Chile*, 1988.

GOURNEAU, J.M., PETIT, T.

(Desinfección de tanques y pozos de estiércol líquido contaminados por aftovirus. Disinfection of liquid manure tanks and pits contaminated by foot and mouth disease virus.) Texto en francés. *Bull. Acad. Vét. France*, 61(3):273-279, 1989. Lab. Rech. Vet., 22 rue Pierre-Curie, BP 67, 94703 Maisons-Alfort, France.

GUILLEMIN, F., GUINET, J.J., MANNATHOKO, M., MOSIENYANE, M.

(Instituto de vacuna antiaftosa de Botswana: resultados de estudios serológicos 1982-1985.) Botswana vaccine institute FMDV: results of serological studies 1982-1985. In: *Foot and mouth disease*. 17th Conf. OIE FMD Commission. Paris, 1-3 October 1986. Paris, France, OIE, 1987. p.16-23 In: *Vet. Bull.*, 60(7):4611, 1990. Botswana Vaccine Institute, Private Bag 0031, Gaborone, Botswana

GÜRHAM, S.I.

(Epidemiología de la fiebre aftosa. Epidemiology of foot and mouth disease.) Texto en turco. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, 59(1-2):99-106, 1989. In: *Index Vet.*, 57(8):38, 1989.

HOUSE, C., HOUSE, J.A.

(Evaluación de técnicas para detectar virus en epitelio lingual bovino: comparación de la sensibilidad de bovinos, ratones, cultivos celulares primarios, cultivos celulares criopreservados y líneas celulares establecidas.) Evaluation of techniques to demonstrate foot-and-mouth disease virus in bovine tongue epithelium: comparison of the sensitivity of cattle, mice, primary cell cultures, cryopreserved cell culture and established cell lines. *Vet. Microbiol.*, 20(2):99-109, 1989. In: *Vet. Bull.*, 59(10):5815, 1989. USDA, Nat. Vet. Serv. Lab., P.O.Box 848, Greenport, NY 11944, USA.

HOUSE, J.A., HOUSE, C., LLEWELLYN, M.E.

(Características de la línea celular de riñón de cerdo IB-RS-2 clon D10 libre del virus del cólera porcino.) Characteristics of the porcine kidney cell line IB-RS-2 clone D10 (IB-RS-2 D10) which is free of hog cholera virus. *Vitro Cell. & Develop. Biol.*, 24(7):677-682, 1989. USDA, APHIS, Nat. Vet. Serv. Lab., Foreign Anim. Dis. Diag. Lab., P.O.Box 848, Greenport, NY 11944, USA.

IVANOV, Ya., TEKERLEKOV, P.

(Tipificación del aftovirus por microprueba de fijación del complemento. Typing aphthovirus by the micro-complement fixation test.) Texto en búlgaro. *Vet. Sbirka*, 87(2):18-21, 1989. In: *Vet. Bull.*, 59(11):6376, 1989. Tsentralen Veterinarnomed. Inst., Sofia, Bulgaria.

JAKOVLJEVIC, D.

Yugoslavia. In: *Foot and mouth disease*. 17th Conf. OIE FMD Commission. Paris, 1-3 October 1986. Paris, France, OIE, 1987. p.125. In: *Index Vet.*, 58(6):70, 1990.

KAADEN, O.R., HASS, L.

(Revisión de la amenaza de enfermedades exóticas para animales de establecimientos. Review of the threat to farm animals from exotic diseases of animals.) Texto en alemán. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 96(6):321-324, 1989. In: *Index Vet.*, 58(1):47, 1990.

KASABOV, R., KOLEVA, P.

(Cultivo de aftovirus en la línea celular "FLK ad". Culture of aphthovirus in cell line "FLK ad".) Texto en búlgaro. *Vet. Sbirka*, 87(8):11-13, 1989. In: *Vet. Bull.*, 60(8):5407, 1990. Inst. Borba Shapa, Sliven, Bulgaria.

KHAN, M.G.A., BASITH, M.A.

(Ocurrencia de fiebre aftosa en *Bos gaurus* cautivo en 1972.) Occurrence of foot and mouth disease in captive gaurs (*Bos gaurus*) in 1972. *Livestock Adviser*, 13(4):37-40, 1988. In: *Index Vet.*, 57(8):38, 1989.

KNÖSEL, H., TIROKE, H.

(Experiencia para controlar un brote de fiebre aftosa en la región de Hanover-República Federal de Alemania. Experience of controlling an outbreak of foot and mouth disease in the Hannover region-Federal Republic of Germany.) Texto en alemán. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 96(5):269-271, 1989. In: *Vet. Bull.*, 60(2):790, 1990. Veterinärdezernat, Marienstrasse 34, D-3000 Hannover 1, German Federal Republic.

KRUG, M., FOLKERS, G., HAAS, B., HESS, G., WIESMUELLER, K.H., FREUND, S., JUNG, G.

(Dinámica molecular del epítoto helicoidal alfa de una nueva vacuna antiaftosa de lipopéptido sintético.) Molecular dynamics of the α -helical epitope of a novel synthetic lipopeptide foot-and-mouth disease vaccine. *Biopolymers*, 28(1):499-512, 1989. In: *Viol. & Aids Abstr.*, 22(8):6068-V22, 1989. Pharmazeutisches Inst., Univ. Tübingen, Tübingen, Federal Republic of Germany.

KRUGLIKOV, B.A., NALIVAICO, V.G., MEL'NIK, R.I., TARASENKO, T.Ya.

(Organización de programas para inmunizar animales de granjas contra la fiebre aftosa. Organisation of programmes for immunizing farm animals against foot and mouth disease.) Texto en ruso. *Veterinariya, Moscow*, 2:33-35, 1989. In: *Vet. Bull.*, 59(7):3953, 1989. Glavnoe Upravlenie Veterinari. Gosagroprom, Moscow, USSR.

- KRUGLIKOV, B.A., SEDOV, V.A., SHTEFAN, M.K., BOIKO, A.A., TARASENKO, T.Ya.
(Principios de organización de medidas de control contra la fiebre aftosa en brotes de severidad variable. Principles of organization of control measures against foot and mouth disease in outbreaks of varying severity.) Texto en ruso. *Veterinariya, Moscow*, 4:35-38, 1989. In: *Vet. Bull.*, 59(9):5114, 1989. Glavnoe Upravleniye Veterinarii, Gosagroprom, Moscow, USSR.
- LIEBERMANN, H., KWASNIOWSKI, W., STREBELOW, G.
(Posibilidades de control biofisicoquímico del antígeno en la producción de vacuna, por ejemplo de aftovirus. —Revisión. Possibilities for biophysicochemical antigen control in vaccine production as exemplified by foot and mouth disease virus. —Review.) Texto en alemán. *Arch. Exper. Vet.*, 42(2): 165-173, 1988. In: *Index Vet.*, 57(1):11, 1989.
- LOMBARD, M.
(Vacunas antiaftosa — diez años de progreso.) Foot-and-mouth disease vaccines — ten years of progress. Presented at the Symp. on FMD, Poultry and Human Dis. USDA, ARS, PIADC, P.O.Box 848, Greenport, NY 11944, USA.
- LOPES, O., SADIR, A.M., MONESIGLIO, L., SCHUDEL, A.A., BRAUN, M.
Captación en el páncreas de virus de la fiebre aftosa (VFA) inyectado intraperitonealmente. (Accumulation in the pancreas of aphthovirus injected intraperitoneally.) *Medicina, Argentina*, 48(6):591, 1988. In: *Index Vet.*, 57(7):6, 1989.
- LORENZ, R.J.
(Evaluación económica de la vacunación antiaftosa en la República Federal de Alemania. Partes 1 y 2. Economic evaluation of vaccination against foot-and-mouth disease in the Federal Republic of Germany. Parts 1 and 2.) Texto en alemán. *Tierärztliche Umschau*, 44(5,6) 275-279, 350...357, 1989. In: *Vet. Bull.*, 59(11):6372, 1989. Bundesforschungsanstalt Viruskrankeheiten Tiere, Postfach 1149, 7400 Tübingen, German Federal Republic.
- LYRA, D.A.
(Informe amplio. Epidemiología de la fiebre aftosa en las Américas: 1982-1986.) Comprehensive report. Epidemiology of FMD in the Americas: 1982-1986. In: *Foot and mouth disease*. 17th Conf. OIE FMD Commission. Paris, 1-3 October 1986. Paris, France, OIE, 1987. p.53-70. In: *Index Vet.*, 58(6):70, 1990.
- MAKARASEN, P.
(Tailandia.) Thailand. In: *Foot and mouth disease*. 17th Conf. OIE FMD Commission. Paris, 1-3 October 1986. Paris, France, OIE, 1987. p.89-92. In: *Index Vet.*, 58(6):70, 1990.
- MALAGA, H., HERRERA, M.
Epidemiología de la fiebre aftosa. (Epidemiology of foot and mouth disease.) *Ciencias Vet., Costa Rica*, 10(4):3-14, 1988. In: *Index Vet.*, 58(3):58, 1990.
- MANNATHOKO, M.M.
(Informe amplio: epidemiología de la fiebre aftosa en Africa 1982-1986.) Comprehensive report: epidemiology of FMD in Africa 1982-1986. In: *Foot and mouth disease*. 17th Conf. OIE FMD Commission. Paris, 1-3 October 1986. Paris, France, OIE, 1987. p.9-15, 1987. In: *Index Vet.*, 58(6): 70, 1990.

MARSILE, A.

(Marruecos.) Morocco. In: **Foot and mouth disease**. 17th Conf. OIE FMD Commission. Paris, 1-3 October 1986. Paris, France, OIE, 1987. p.37-39. In: *Index Vet.*, 58(6):70, 1990.

MATHUR, S.C.

(Informe amplio. Epidemiología de la fiebre aftosa en Asia, Extremo Oriente y Oceanía: 1982-1986.) Comprehensive report. Epidemiology of FMD in Asia, the Far East and Oceania: 1982-1986. In: **Foot and mouth disease**. 17th Conf. OIE FMD Commission. Paris, 1-3 October 1986. Paris, France, OIE, 1987. p.72-81. In: *Index Vet.*, 58(6):70, 1990.

McKERCHER, P.D.

(Informe amplio. Adyuvantes, actividad inmunizante.) Comprehensive report. Adjuvants-immunizing activity. In: **Foot and mouth disease**. 17th Conf. OIE FMD Commission. Paris, 1-3 October 1986. Paris, France, OIE, 1987. p.353-362. In: *Index Vet.*, 58(6):16, 1990.

MELOEN, R.H., PUYK, W.C., LANKHOF, H., BEKKUM, J.G.van, THOMAS, A., SCHAAPER, W.M.M.

(Especificidad del aminoácido único de subpoblaciones de antiaftovirus completos presentes en sueros policlonales antipéptido.) Specificity at the level of single amino acids of anti-whole foot-and-mouth disease virus subpopulations present in polyclonal anti-peptide sera. In: **Synthetic problems. Approaches to biological problems**. Proceedings of a Glaxo-UCLA Colloquium held at Park City, Utah, January 31-February 4, 1988. Ed. J.P. Tam, E.T. Kaiser. In: *UCLA Symp. on Molec. and Cell. Biol.* New York, NY, Alan R. Liss, Inc., 1989. V.86. p.171-180. In: *Vet. Bull.*, 60(8):5495, 1990. Central Veterinary Institute, P.O.Box 65, 8200 AB Lelystad, The Netherlands.

MOORE, D.M., VAKHARIA, V.N., MORGAN, D.O.

(Identificación de epítopes neutralizantes de virus en ocurrencias naturales de variantes de tipo A₁₂ de aftovirus.) Identification of virus neutralizing epitopes on naturally occurring variants of type A₁₂ foot-and-mouth disease virus. *Virus Res.*, 14(4):281-295, 1989. In: *Index Vet.*, 58(6):16, 1990.

MOUGEOT, H., REYNAUD, G., ROULET, C., STELLMANN, C., TIXIER, G.

(Inocuidad y actividad de dos adyuvantes oleosos usados en la preparación de vacunas antiaftosa para cerdos.) Innocuity and activity of two oil adjuvants used in preparing FMD vaccines for pigs. In: **Foot and mouth disease**. 17th Conf. OIE FMD Commission. Paris, 1-3 October 1986. Paris, France, OIE, 1987. p.370-382. In: *Vet. Bull.*, 60(7):4622, 1990. Rhone Mérieux, Lab. IFFA, 254 rue Marcel Mérieux, B.P. 7009, Lyon Cedex 07, France.

MOUTOU, F.

(Epidemiología operacional y fiebre aftosa. Operational epidemiology and foot and mouth disease.) Texto en francés. *Epid. Santé Anim.*, 13:51-64, 1988. In: *Index Vet.*, 57(2):36, 1989.

MOUTOU, F., CRABOL, B., STRAUSS, B.

(Modelo para pronosticar la diseminación de fiebre aftosa por el aire. Recolección de datos e integración en un esquema de intervención de emergencia.) Model for forecasting the airborne spread of foot and mouth disease. Collection of data and integration into an emergency intervention scheme. In: **Foot and mouth disease**. 17th Conf. OIE FMD Commission. Paris, 1-3 October 1986. Paris, France, OIE, 1987. p.316-319. In: *Index Vet.*, 58(6):71, 1990.

MOWAT, G.N.

(Informe amplio. Epidemiología de la fiebre aftosa en Europa 1982-1986.) Comprehensive report. Epidemiology of FMD in Europe 1982-1986. In: **Foot and mouth disease**. 17th Conf. OIE FMD Commission. Paris, 1-3 October 1986. Paris, France, OIE, 1987. p.93-95. In: **Index Vet.**, 58(6):70, 1990.

MOWAT, G.N.

(Detección, identificación y diferenciación de aftovirus a través de modernas técnicas de laboratorio — significación biológica y repercusiones sobre el control de la enfermedad.) Detection, identification & differentiation of FMD viruses through modern laboratory techniques — biological significance and repercussions on control of the disease. In: **Foot and mouth disease**. 17th Conf. OIE FMD Commission. Paris, 1-3 October 1986. Paris, France, OIE, 1987. p.254-256. In: **Index Vet.**, 58(6):16, 1990.

MÜLLER, H.K., VILLINGER, F., GRIOT, C., ACKERMANN, M., BRUCKNER, L., KIHLM, U.

(Vacunación contra la fiebre aftosa en Suiza. I. Prueba de potencia e inmunidad del rebaño. Vaccination against foot and mouth disease in Switzerland. I. Potency testing and herd immunity.) Texto en alemán. **Schweiz. Arch. Tierheilk.**, 131:379-386, 1989. Eidg. Vakzine-Institute, Postfach, 4025 Basel, Switzerland.

NORRIS, R.J.

(Estrategias de control de la fiebre aftosa basadas en sistemas epidemiológicos y producción animal.) FMD control strategies based on epidemiological and animal production systems. In: **Foot and mouth disease**. 17th Conf. OIE FMD Commission. Paris, 1-3 October 1986. Paris, France, OIE, 1987. p.339-350. In: **Index Vet.**, 58(6):71, 1990.

PANINA, G.F.

(Detección, identificación y diferenciación de aftovirus a través de modernas técnicas de laboratorio — significación biológica y repercusiones en el control de la enfermedad.) Detection, identification & differentiation of FMD viruses through modern laboratory techniques — biological significance and repercussions on control of the disease. In: **Foot and mouth disease**. 17th Conf. OIE FMD Commission. Paris, 1-3 October 1986. Paris, France, OIE, 1987. p.129-131. In: **Index Vet.**, 58(6):16, 1990.

PANINA, G., AMADORI, M., BUONAVOGLIA, C., GUARDO, G. di.

(Italia.) Italy. In: **Foot and mouth disease**. 17th Conf. OIE FMD Commission. Paris, 1-3 October 1986. Paris, France, OIE, 1987. p.97-106. In: **Index Vet.**, 58(6):70, 1990.

PANINA, G.F., CIVARDI, A., MASSIRIO, I. *et al.*

(Sobrevivencia de aftovirus en salame italiano.) Survival of foot-and-mouth disease virus in sausage meat products (Italian salami). **Int. J. Food. Microbiol.**, 8:141-148, 1989. In: **FMD Bull.**, 27(3):89/55, 1989. Inst. Zooprof. Sperimentale, Brescia, Italia.

PANJEVIC, D., VALCIC, M.

(Inmunidad humoral de cerdos neonatos tras vacunación antiaftosa.) Humoral immunity of neonatal swine after FMD vaccination. **J. Vet. Med.**, B, 36(2):119-122, 1989. In: **Vet. Bull.**, 59(10):5812, 1989. Fac. Vet. Med., Univ., Belgrade, Yugoslavia.

PARRY, N.R., BARNETT, P.V., OULDRIDGE, E.J., ROWLANDS, D.J., BROWN, F.

(Epítopes neutralizantes del aftovirus tipo O. II. Mapeamiento de tres sitios conformacionales con reactivos de péptido sintético.) Neutralizing epitopes of type O foot-and-mouth disease virus. II.

Mapping three conformational sites with synthetic peptides reagents. *J. gen. Virol.*, 70(6):1493-1503, 1989. Dep. Virol., Wellcome Biotech. Ltd., Langley Court, Beckenham, Kent BR3 3BS, UK.

PAY, T.W.F.

(Control de la fiebre aftosa en bovinos por vacunación.) Control of foot and mouth disease in cattle by vaccination. *FMD Bull.*, 27(2):1-9, 1989. Coopers Animals Health Ltd., FMD Vaccine Lab., Ash Rd., Pirbright, Surrey GU24 0NF, UK.

PECKER, A.E.

Erradicar la fiebre aftosa: para asegurar la calidad en las carnes argentinas. In: *Argentina Agropecuaria e Industrial*, 1989. p.28-32.

PERL, S., YADIN, H., YAKOBSON, B., ZUCKERMAN, E., ORGAD, U.

(Cambios patológicos en gacelas de montaña desafiadas con aftovirus, con especial referencia a lesiones en el páncreas.) Pathological changes in mountain gazelles challenged with FMD virus, with special reference to pancreatic lesions. *Rev. Sci. tech. Off. int. Epiz.*, 8(3):765-769, 1989. Kimron Vet. Inst., Beit-Dagan, Israel.

PERPERE, L.

(Diez años de profilaxis de la fiebre aftosa en Francia 1976-1986.) Ten years of prophylaxis of FMD in France 1976-1986. In: *Foot and mouth disease*. 17th Conf. OIE FMD Commission. Paris, 1-3 October 1986. Paris, France, OIE, 1987. p.320-330. In: *Index Vet.*, 58(6):71, 1990.

PICCONE, M.E., MARCOVECCHIO, F., ARESE, A., ZULOAGA, G.

Uso de las células de sarcoma 180 TG para la obtención de flúidos ascíticos hiperinmunes de ratón para virus aftoso. (Use of sarcoma 180 TG cells in mice to obtain ascitic fluid hyperimmune to foot-and-mouth disease virus.) *Rev. Argentina Microbiol.*, 21(2):75-78, 1989. In: *Vet. Bull.*, 60(7):4624, 1990. Inst. Virol., CICV, INTA, CC 77, 1708 Morón, Buenos Aires, Argentina.

POLYDOROU, K.

(Estrategias de control de la fiebre aftosa basadas en epidemiología y sistemas de producción animal.) Foot and mouth disease control strategies based on epidemiology and animal production systems. In: *Foot and mouth disease*. 17th Conf. OIE FMD Commission. Paris, 1-3 October 1986. Paris, France, OIE, 1987. p.312-315. In: *Index Vet.*, 58(6):71, 1990.

PORTIANSKY, E.L., DIGIROLAMO, W.M.T., LAGUENS, R.P.

(Actividad protectora e inmunoestimulante de una dosis baja de ciclofosfamida en la infección experimental de ratones con aftovirus.) Protective and immunostimulating activity of a low dose of cyclophosphamide in the experimental infection of mice with foot-and-mouth disease virus. *Experientia*, 45(1):110-112, 1989. In: *Vet. Bull.*, 59(10):5811, 1989. Fac. Cienc. Méd., Univ. Nac., 1900 La Plata, Argentina.

PRASAD, S., AHUJA, K.L.

(Fiebre aftosa y su control en animales.) Foot-and-mouth disease and its control in animals. *Indian Farming*, 38(3):34-35, 1988. In: *Index Vet.*, 57(1):49, 1989.

RADLETT, P.J.

(La inactivación del aftovirus con aziridina.) The inactivation of foot and mouth disease with aziridine inactivants. *FMD Bull.*, 27(1):1-6, 1989.

RAMARAO, O.

(Una década de fiebre aftosa en Andhra Pradesh y Maharashtra, 1968-77.) A decade of foot-and-mouth disease in Andhra Pradesh and Maharashtra (1968-77). *Indian J. Anim. Sci.*, 58(6):678-683, 1988. In: *Index Vet.*, 58(1):47, 1990.

RAMAYO, L., JAR, A.M., MUNDO, S., BRAUN, M.

Respuesta inmune celular en bovinos vacunados contra el virus de la fiebre aftosa (VFA). (Cellular immune response in cattle vaccinated against foot and mouth disease.) *Medicina, Argentina*, 48(6):660, 1988. In: *Index Vet.*, 57(7):29, 1989.

ROJAHN, A.

(La República Federal de Alemania libre de fiebre aftosa.) Federal Republic of Germany free from foot and mouth disease. *Dis. Inf., Off. int. Epiz.*, 1(2):6, 1988. In: *Index Vet.*, 57(6):56, 1989.

ROSENBERG, F.J.

(Informe amplio. Planeamiento de la erradicación de la fiebre aftosa: ecosistemas y estrategias regionales.) Comprehensive report. Planning of FMD eradication: ecosystem and regional strategies. In: **Foot and mouth disease**. 17th Conf. OIE FMD Commission. Paris, 1-3 October 1986. Paris, France, OIE, 1987. p.259-266. In: *Index Vet.*, 58(6):70, 1990.

RWEYEMAMU, M.M., UMEHARA, O., MEDEIROS-NETO, R.R., SCHIAPPACASSI, C.A.

(Un adyuvante amino lipoidal sintético: avridina.) A lipoidal amine synthetic adjuvant: avridine. In: **Foot and mouth disease**. 17th Conf. OIE FMD Commission. Paris, 1-3 October 1986. Paris, France, OIE, 1987. p.383-394. In: *Vet. Bull.*, 60(7):4623, 1990. Pfizer SA, Caixa Postal 143, 07111 Guarulhos, Sao Paulo, Brasil.

RYBAKOV, S.S., KHAPAEVA, L.D., SINYAKOVA, O.N., IVANYUSCHENKOV, V.N., SHAZHKO, Zh.A., FOMINA, T.A., KAMALOVA, N.E., MOLCHANOVA, A.I.

(Radioinmunoensayo de fase sólida en placas de polietileno para detectar aftovirus. Solid-phase radioimmunoassay on polyethylene plates for detecting aphthovirus.) Texto en ruso. *Veterinariya*, 6:53-57, 1989. In: *Vet. Bull.*, 59(11):6378, 1989. Vsesoyuznyi Yashchurnyi Institut, USSR.

SAHA, S.N.

(Desarrollo de un medio con peptona indígena e hidrolizado de proteína para el crecimiento de aftovirus en células BHK-21.) Development of medium with indigenous peptone and protein hydrolysate for the growth of foot-and-mouth disease virus in BHK-21 cells. *Indian J. Anim. Sci.*, 58(6):627-631, 1988. In: *Vet. Bull.*, 60(1):140, 1990. Indian Vet. Res. Inst., Bangalore Campus, Karnataka-560 024, India.

SAHA, S.N., SEN, A.K.

(Reemplazo parcial de suero con peptona e hidrolizado de lactalbúmina para la producción de vacuna antiaftosa en células BHK-21.) Partial replacement of serum with peptone and lactalbumin hydrolysate for the production of foot-and-mouth disease vaccine in BHK-21 cells. *Acta virol.*, 33:338-343, 1989. Indian Vet. Res. Inst., Bangalore Campus, Karnataka-560 024, India.

SAHA, S.N., SEN, A.K.

(El uso de suero de matadero para la producción de vacuna antiaftosa en larga escala.) Use of slaughter-house serum for large scale production of foot and mouth disease vaccine. *Int. J. Anim. Sci.*, 4(1):20-22, 1989. In: *FMD Bull.*, 27(3):89/47, 1989. Indian Vet. Res. Inst., Bangalore Campus, Karnataka-560 024, India.

SAHA, S.N., SEN, A.K.

(Estudios para el desarrollo de un medio con peptona e hidrolizado de caseína para la producción de vacuna antiaftosa en células BHK-21.) Studies on the development of a medium with peptone and casein hydrolysate for the production of foot-and-mouth disease vaccine in BHK-21 cells. *Vaccine*, 7(4):357-363, 1989. Indian Vet. Res. Inst., Bangalore Campus, Bangalore, Karnataka-560 024, India.

SAHA, S.N., SEN, A.K.

(Suero de leche como un suplemento para el crecimiento de aftovirus en células BHK-21.) Milk whey as a serum supplement for the growth of FMD virus in BHK-21 cells. *Vet. Res. Communic.*, 13(2): 89-92, 1989. In: *Vet. Bull.*, 59(8):4604, 1989. Indian Vet. Res. Inst., Bangalore Campus, Karnataka-560 024, India.

SAIZ, J.C., GONZALEZ, M.J., MORGAN, D.O. *et al.*

(Comparación antigénica de diferentes tipos de aftovirus usando anticuerpos monoclonales que definen epítopes neutralizantes múltiples de los subtipos A₅.) Antigenic comparison of different foot-and-mouth disease virus types using monoclonal antibodies defining multiple neutralizing epitopes of FMDV A₅ subtypes. *Virus Res.*, 13:45-60, 1989. In: *FMD Bull.*, 27(3):89/57, 1989. Molec. Biol. Lab., USDA-ARS, Plum Island Animal Disease Center, Greenport, NY 11944, USA.

SCHOLZ, H.

(Lesiones postvacunales en las patas después de la vacunación contra la fiebre aftosa. Postvaccinal claw lesions after vaccination against foot and mouth disease.) Texto en alemán. *Praktische Tierarz.*, 69:85-88, 1988 (Sondernummer). In: *Index Vet.*, 57(4):42, 1989.

SHIMSHONY, A.

Israel. In: *Foot and mouth disease*. 17th Conf. OIE FMD Commission. Paris, 1-3 October 1986. Paris, France, OIE, 1987. p.82-86. In: *Index Vet.*, 58(6):70, 1990.

SHIMSHONY, A.

(Fiebre aftosa en Israel.) Foot and mouth disease in Israel. *Dis. Inf., Off. int. Epiz.*, 1(1):2, 1988. In: *Index Vet.*, 57(6):56, 1989.

SHIMSHONY, A.

(Situación de la fiebre aftosa en Israel.) Status of foot and mouth disease in Israel. *Dis. Inf., Off. int. Epiz.*, 1(2):6-7, 1989. In: *Index Vet.*, 57(6):56, 1989.

SIGA, L.J., GOMEZ, G., BRAUN, M.

Eosinofilia y neutropenia en bovinos vacunados contra la fiebre aftosa. (Eosinophilia and neutropenia in cattle vaccinated against foot and mouth disease.) *Medicina, Argentina*, 48(6):592, 1988. In: *Index Vet.*, 57(7):29, 1989.

SILVA, J.A. da, MACHADO, T.M.M., MODENA, C.M., VIANA, F.C., MOREIRA, E.C., ABREU, V.V. de.

(Frecuencia de fiebre aftosa, lengua azul y leucosis enzoótica bovina en caprinos bajo diferentes sistemas de producción en el Estado de Minas Gerais. Frequency of foot and mouth disease, bluetongue and bovine oncovirus antibodies in goats under different systems in Minas Gerais State.) Texto en portugués. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 40(6):393-403, 1988. In: *Vet. Bull.*, 60(1):177, 1990. Esc. Vet. Univ., CP 567, 3-161 Belo Horizonte, MG, Brasil.

SKINNER, H.H.

(Los orígenes de la investigación de virus en Pirbright.) The origins of virus research at Pirbright. *Vet. History*, 6(1):31-40, 1989. In: *Index Vet.*, 58(8):40, 1990.

SOUKHAREV, O.I., RAKHMANOV, A.M., GOUSSEV, A.A.

(URSS.) U.S.S.R. In: *Foot and mouth disease*. 17th Conf. OIE FMD Commission. Paris, 1-3 October 1986. Paris, France, OIE, 1987. p.122-124. In: *Index Vet.*, 58(6):70, 1990.

SUROVOI, A.Yu., VOL'PINA, O.M., SNETKOVA, E.V., VOLKOVA, T.D., IVANOV, V.T., CHEPURKIN, A.V., IVANYUSHCHENKOV, V.N., BURDOV, A.N., DRYAGALIN, N.N.

(Estructura antigénica del aftovirus. I. Síntesis de los péptidos protectores derivados de la región inmunogénica principal de la proteína VP1 de la cepa O₁K. Antigenic structure of aphthovirus. I. Synthesis of protective peptides derived from the principal immunogenic region of VP1 protein from virus strain O₁K.) Texto en ruso. *Bioorganicheskaya Khimiya*, 14(10):1352-1362, 1988. In: *Vet. Bull.*, 60(3):1533, 1990. Inst. Bioorgan. Khimiya, Akademiya Nauk, Moscow, USSR.

TESAR, M., BERGER, H.G., MARQUARDT, O.

(Sondas serológicas para algunas proteínas no estructurales del aftovirus.) Serological probes for some foot-and-mouth disease virus nonstructural proteins. *Virus Genes*, 3(1):29-44, 1989. In: *FMD Bull.*, 27(3):89/58, 1989. Fed. Res. Center Virus Dis. Anim., Tübingen, Federal Republic of Germany.

THALMANN, G., FELFE, P., NOCKLER, A.

(Importancia actual de la fiebre aftosa — su prevención y control efectivo. Importance of foot and mouth disease today — its prevention and effective control.) Texto en alemán. *Arch. Exper. Vet.*, 42(2):183-193, 1988. In: *Index Vet.*, 58(1):49, 1989.

THOMSON, G.R.

(Africa del Sur.) South Africa. In: *Foot and mouth disease*. 17th Conf. OIE FMD Commission. Paris, 1-3 October 1986. Paris, France, OIE, 1987. p.40. In: *Index Vet.*, 58(6):70, 1990. FMD Lab., Vet. Res. Inst., Onderstepoort 0110, South Africa.

THOMSON, G.R., GAINARU, M.D., BENGIS, R.G.

(Africa del Sur. Parque Nacional Kruger. El papel del búfalo africano en la epidemiología de la fiebre aftosa.) South Africa. Kruger National Park. Role of the African buffalo (*Syncerus caffer*) in the epidemiology of FMD. In: *Foot and mouth disease*. 17th Conf. OIE FMD Commission. Paris, 1-3 October 1986. Paris, France, OIE, 1987. p.41-49. In: *Index Vet.*, 58(6):70, 1990.

TORRE, J.C. de la, LUNA, S. de la, DIEZ, J., DOMINGO, E.

(Resistencia al aftovirus por medio de productos que *trans*-actúan en la célula.) Resistance to foot-and-mouth disease virus mediated by *trans*-acting cellular products. *J. Virol.*, 63(5):2385-2387, 1989. Dr. E.Domingo, Centro Biol. Mol., Univ. Autónoma, Canto Blanco, 28049 Madrid, España.

VOL'PINA, O.M., SUROVOI, A.Yu., UL'YASHIN, V.V., IVANOV, V.T., BURDOV, A.N., DRYAGALIN, N.N.

(Estructura antigénica del aftovirus. II. Síntesis de los péptidos protectores derivados de la región principal inmunogénica de la proteína VP1 de la cepa A₂₂. Antigenic structure of aphthovirus. II. Synthesis of protective peptides derived from the principal immunogenic region of VP1 protein from virus strain A₂₂.) Texto en ruso. *Bioorganicheskaya Khimiya*, 14(10):1363-1371, 1988. In: *Vet. Bull.*, 60(3):1534, 1990. Inst. Bioorgan. Khimiya, Akademiya Nauk, Moscow, USSR.

WILKS, C.R.

(Fiebre aftosa — aún un gran problema.) Foot-and-mouth disease — still a major problem. In: **Second Int. Cong. Sheep Vet.**, Massey Univ., Palmerston North, New Zealand, February 1-16, 1989. Wellington, New Zealand, New Zealand Veterinary Association, 1989. p.366-371. In: **Index Vet.**, 58(1):46, 1990.

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; Referencias y Agradecimientos. 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 un 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. Raúl Casas Olascoaga, Director
Dr. A. Alonso F., Jefe de los Laboratorios
Dr. Vicente M. Astudillo, Jefe de Asistencia Técnica
Dr. Jaime Estupiñán A., Epidemiólogo

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, References and Acknowledgments. An abstract of no more than 250 words should accompany the article.

Brief Report: short (6-7 typewritten pages) complete scientific work: results and discussion can be presented with the data, which should be limited to 2 tables.

Preliminary Communication: short summary of work in progress; 3-4 pages; maximum of 2 tables.

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

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

1. All manuscripts presented to the BOLETIN 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. Raúl Casas Olascoaga, Director
Dr. A. Alonso F., Chief, Laboratory Services
Dr. Vicente M. Astudillo, Chief, Technical Assistance
Dr. Jaime Estupiñán A., Epidemiologist